

KATA PENGANTAR

Pratikum Mikrobiologi Pangan merupakan salah satu praktikum wajib yang harus dipelajari seluruh mahasiswa program studi Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Katolik Soegijapranata. Melalui praktikum Mikrobiologi Pangan, mahasiswa diharapkan dapat memiliki kemampuan dalam mempraktekkan teori-teori yang diberikan pada saat kuliah Mikrobiologi Pangan. Modul petunjuk pratikum Mikrobiologi Pangan diharapkan dapat menjadi petunjuk bagi mahasiswa pada saat melakukan kegiatan pratikum.

Dalam kesempatan ini kami ucapkan terimakasih kepada mahasiswa (Josephine Claretta B, Hosana Shintya, Felicia Elisabeth, Eleonora Pradnya Nirmala Citta, Ignasia Isabella Susanto, Agusriani, Stella Amanda, Gregorius Nico Adi Setiawan) sebagai asisten praktikum dalam pelaksanaan kegiatan pratikum Mikrobiologi Pangan pada semester genap tahun ajaran 2017/2018.

Semarang, April 2018

Dekan Fakultas Teknologi Pertanian

MODUL PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI PANGAN

Disusun Oleh:

Dr. Ir. Lindayani, MP.

Dra. Laksmi Hartayanie, MP.

Josephine Claretta B

Hosana Shintya

Felicia Elisabeth

Eleonora Pradnya Nirmala Citta

Ignasia Isabella Susanto

Agusriani

Stella Amanda

Gregorius Nico Adi Setiawan



**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI PANGAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS KATOLIK SOEGIJAPRANATA
SEMARANG**

2018

TATA TERTIB PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI PANGAN

1. Praktikan wajib datang 15 menit sebelum praktikum dimulai.
2. **Praktikan wajib mengenakan jas laboratorium dan membawa segala keperluan praktikum untuk / selama praktikum.**
3. Praktikan wajib telah memahami benar prosedur kerja yang akan dilaksanakan pada waktu praktikum.
4. Praktikan tidak makan, minum atau merokok selama praktikum di dalam laboratorium.
5. Praktikan tidak dibenarkan keluar dari laboratorium tanpa sepengetahuan dan seizin asisten. Dalam hal ini praktikan tidak boleh keluar laboratorium secara rombongan (maksimal 2 orang).
6. Praktikan bertanggung jawab penuh atas kebersihan, keutuhan dan keamanan barang-barang inventaris laboratorium.
7. Praktikan bertanggung jawab penuh atas keselamatan diri sendiri, dan orang lain yang ada di dalam laboratorium.
8. Praktikan bertanggung jawab penuh atas keamanan barang-barang berharga milik pribadi (handphone, uang, dll.).
9. **Toleransi keterlambatan praktikum hanya 15 menit dengan konsekuensi tidak diperbolehkan mengikuti kuis dengan materi pada hari itu.**
10. **Keterlambatan lebih dari 15 menit, tidak diperbolehkan membuat laporan praktikum, dan mendapat nilai 0 untuk materi hari itu.**
11. Praktikan yang tidak mengikuti praktikum dengan alasan yang tidak jelas, konsekuensinya sama dengan no. 10.
12. Jika praktikan tidak dapat mengikuti praktikum, dengan alasan yang benar-benar mendesak, dapat diterima dan masuk akal, maka praktikan wajib memberitahu asisten dosen, minimal 1 hari sebelumnya.

Peraturan-peraturan lain yang belum tercantum akan disampaikan secara lisan oleh asisten pada saat pelaksanaan praktikum.

KETERANGAN PRAKTIKUM

Penilaian Praktikum :

- | | |
|-------------|------|
| 1. Kuis | 15% |
| 2. Laporan | 35 % |
| 3. Responsi | 50 % |

Penilaian Laporan Resmi :

- | | |
|--|----|
| 1. Tinjauan Pustaka & Tujuan Praktikum | 15 |
| 2. Materi dan Metode | 10 |
| 3. Hasil Pengamatan | 15 |
| 4. Pembahasan | 40 |
| 5. Kesimpulan | 10 |
| 6. Daftar Pustaka | 10 |
| 7. Lampiran | - |

PERATURAN LAPORAN RESMI

Laporan kelompok dikumpulkan **1 minggu** setelah ACC laporan sementara, maksimal pukul 15.00 WIB.

Keterlambatan pengumpulan dari jadwal yang sudah disepakati akan mendapatkan sanksi pengurangan nilai **25% nilai akhir** laporan *setiap harinya* (pergantian hari terhitung setiap jam 15.00 sore).

Laporan resmi wajib di-**Plagscan atau Unicheck (hasil pengamatan, pembahasan, kesimpulan) dan disertakan bukti plagscan di bagian lampiran. Toleransi maksimal 10%**, jika lebih maka akan dilakukan pengurangan sesuai kebijakan

Format laporan sesuai dengan panduan yang telah diberikan.

Laporan resmi disertakan dua jurnal (internasional dan nasional) minimal tahun 2008 (untuk masing-masing bab). Jurnal harus dibahas dalam pembahasan sebagai sitasi dan abstrak jurnal dilampirkan pada laporan resmi (pembahasan jurnal tidak dipisah namun dikaitkan dengan hasil praktikum).

Bila jurnal tidak dibahas, penilaian akan dikurangi sebanyak 5 poin tiap jurnalnya

Peraturan-peraturan lain yang belum tercantum akan **disampaikan** secara **lisan** oleh asisten praktikum pada saat pelaksanaan praktikum.

DAFTAR ISI

BAB 1. Mikroskop dan Pewarnaan	
Ignasia Isabella Susanto.....	1
BAB 2. Media dan Sterilisasi	
Josephine Claretta B	12
BAB 3. Fermentasi	
Gregorius Nico.....	21
BAB 4. Pengaruh O ₂	
Eleonora Pradnya N.C.	27
BAB 5. Enumerasi	
Felicia Elisabeth & Stella Amanda	33
BAB 6. Isolasi	
Hosana Shintya & Agusriani	47

JADWAL PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI PANGAN 2018

14/5	15/5	16/5	17/5	18/5	19/5
Media A Fermentasi A Nico, Pin	Enumerasi A Isolasi ₁ A Feli, Stel, Ags	Pengaruh O₂ A Isolasi₂ A Elen, Hos, Ags	<i>Pengamatan:</i> <i>Enumerasi A</i> Mikroskop A Feli, Bel	<i>Pengamatan:</i> <i>Fermentasi A</i> <i>Isolasi₂ A</i> <i>Pengaruh O₂ A</i> Media B Fermentasi B Nico, Ags, Elen, Pin	Isolasi ₁ B Enumerasi B Mikroskop B Hos, Feli, Stel, Bel
21/5	22/5	23/5	24/5	25/5	26/5
<i>Pengamatan :</i> <i>Enumerasi B</i> Isolasi₂ B Mikroskop B Pengaruh O₂ B Stel, Hos, Ags, Bel, Elen	<i>Pengamatan:</i> <i>Fermentasi B</i> Fermentasi C Nico, Pin, Bel	<i>Pengamatan :</i> <i>Isolasi₂ B</i> <i>Pengaruh O₂ B</i> Media C Hos, Elen, Pin	Isolasi ₁ C Enumerasi C Pengaruh O₂ C Ags, Feli, Stel, Elen	Isolasi₂ C Mikroskop C Hos, Ags	<i>Pengamatan:</i> <i>Fermentasi C</i> <i>Pengaruh O₂ C</i> <i>Enumerasi C</i> Fermentasi D Nico, Elen, Feli, Bel

28/5	29/5	30/5	31/5	1/6	2/6
<i>Pengamatan : Isolasi₂ C</i> Media E Mikroskop E Hos, Pin, Bel		Isolasi₁ D Media D Ags, Pin	<i>Pengamatan: Fermentasi D</i> Isolasi ₂ D Enumerasi D Pengaruh O₂ D Hos, Ags, Feli, Stel, Pin		<i>Pengamatan: Enumerasi D Pengaruh O₂ D Isolasi₂ D</i> Media F Fermentasi F Hos, Stel, Elen, Nico, Pin
4/6	5/6	6/6	7/6	8/6	9/6
Isolasi₁ E Fermentasi E Nico, Ags	Isolasi ₂ E Enumerasi E Pengaruh O₂ E Hos, Ags, Feli, Stel, Elen	<i>Pengamatan : Fermentasi F</i> Isolasi ₁ F Enumerasi F Pengaruh O₂ F Nico, Hos, Feli, Stel, Elen	<i>Pengamatan: Isolasi₂ E Enumerasi E Pengaruh O₂ E</i> Isolasi₂ F Mikroskop F Hos, Ags, Feli, ,Elen, Bel	<i>Pengamatan: Fermentasi E Enumerasi F Pengaruh O₂ F</i> Mikroskop D Nico, Stel, Elen, Bel	<i>Pengamatan : Isolasi₂ F</i> Hos

DAFTAR KELOMPOK PRAKTIKUM MIKROBIOLOGI PANGAN 2018

Kloter Kelompok	1	2	3	4	5	6
A	17.II.0063 17.II.0119 17.I2.0015 17.II.0021 17.II.0089	15.II.0074 17.II.0058 17.I2.0018 17.II.0032 17.II.0064	17.II.0135 17.II.0037 17.II.0033 17.II.0011	17.II.0041 17.II.0139 17.II.0099 17.I2.0016	04.70.0152 17.I2.0019 17.II.0012 17.II.0153 17.II.0117	17.II.0088 17.II.0009 17.II.0138 17.II.0018
B	13.70.0113 17.I2.0027 17.II.0005 17.II.0020	16.II.0157 17.II.0156 17.I2.0032 17.II.0024	17.I2.0025 17.II.0072 17.II.0003 17.II.0034 17.II.0087	17.II.0149 17.I2.0021 17.II.0001 17.II.0037 17.II.0042	17.II.0085 17.II.0038 17.II.0120 17.II.0073 17.II.0069	17.II.0161 17.I2.0011 17.II.0154 17.II.0102
C	17.II.0054 17.II.0141 17.I2.0029 17.II.0091	17.II.0077 17.II.0133 17.II.0047 17.II.0081 17.II.0070	17.II.0146 17.II.0016 17.I2.0014 17.II.0122	17.II.0090 17.I2.0013 17.II.0093 17.II.0158	17.I2.0004 17.II.0157 17.II.0008 17.II.0145 17.II.0074	17.II.0045 17.I2.0003 17.II.0160 17.II.0150 17.II.0039
D	17.I2.0038 17.II.0159 17.II.0140 17.II.0027 17.II.0051	17.I2.0036 17.II.0065 17.II.0010 17.II.0147	17.II.0101 17.I2.0037 17.II.0138 17.II.0151 17.II.0078	17.II.0108 17.I2.0020 17.II.0006 17.II.0129	17.II.0152 17.I2.0031 17.II.0002 17.II.0095	17.II.0043 17.II.0113 17.I2.0033 17.II.0112

E	17.I1.0019 17.I1.0096 17.I1.0143 17.I1.0148	17.I1.0124 17.I1.0121 17.I2.0030 17.I1.0132	17.I1.0049 17.I1.0131 17.I1.0014 17.I2.0005	17.I2.0008 17.I1.0105 17.I1.0004 17.I1.0110	17.I1.0118 17.I1.0068 17.I2.0012 17.I1.0107	17.I2.0017 17.I1.0094 17.I1.0097 17.I1.0130 17.I1.0067
F	17.I1.0116 17.I1.0080 17.I1.0062 17.I2.0001	17.I1.0030 17.I2.0035 17.I1.0100 17.I1.0155	17.I1.0052 17.I1.0023 17.I1.0151 17.I2.0009 17.I1.0048	17.I1.0144 17.I1.0036 17.I1.0137 17.I2.0026	17.I1.0007 17.I1.0111 17.I1.0056 17.I2.0024	17.I1.0142 17.I1.0071 17.I1.0109 17.I2.0010 17.I2.0044

MIKROSKOP DAN PEWARNAAN

1. TUJUAN PRAKTIKUM

Tujuan dilakukannya praktikum ini adalah mengetahui jenis pengecatan, fungsi dan perbedaan masing-masing pengecatan., mengetahui zat-zat warna dan zat-zat lain yang digunakan untuk pengecatan, mengetahui dan mempraktikan beberapa cara pengecatan, mengetahui bentuk sel dan bentuk koloni mikroorganisme, mengenali morfologi dari beberapa *yeast*, mengetahui perbedaan dan ciri-ciri antara bakteri gram positif dan bakteri gram negatif, dan mengklasifikasikan bakteri berdasarkan komposisi dinding sel dan ada tidaknya endospora.

2. TINJAUAN PUSTAKA

Mikrobiologi merupakan ilmu yang mempelajari tentang makhluk yang memiliki sifat mikroskopik yang dikenal dengan nama mikroorganisme atau jasad renik, sehingga setiap individu selnya tidak mungkin dapat dilihat langsung oleh mata (Fardiaz, 1992). Mikroskop dibedakan atas beberapa jenis, tetapi prinsip kerjanya pada umumnya sama, yaitu terdiri dari *sistem optikal* atau sistem pembesar dan *sistem iluminasi* yang menyebabkan terlihatnya spesimen atau objek.

Mikroskop memiliki 2 sistem lensa, yaitu lensa objektif dan lensa okuler. Lensa okuler merupakan lensa yang berhubungan langsung dengan mata. Perbesaran yang dimiliki lensa okuler adalah 6x, 8x, dan 10x. Fungsi lensa okuler adalah membuat bayangan semu yang terakhir dari suatu objek yang diamati dapat langsung dilihat dengan mata. Lensa objektif merupakan lensa yang digunakan untuk memperbesar objek (benda) yang dilihat dan menghasilkan bayangan yang nyata dari benda tersebut. Bayangan yang dihasilkan oleh lensa objektif akan diperbesar lagi oleh lensa okuler (Waluyo, 2010).

Bagian-bagian mikroskop dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Bagian-bagian Mikroskop (sederhana)

Cara yang digunakan untuk mengamati bentuk atau ciri-ciri mikroba dengan menggunakan mikroskop ada 2, yaitu: [1] dengan cara mengamati sel-sel mikroba yang masih hidup tanpa diwarnai, yaitu dengan cara membuat preparat basah, dan [2] dengan cara mengamati sel-sel mikroba yang telah mati dan diwarnai. Kebanyakan sel bakteri tidak berwarna, sehingga jika dilarutkan di dalam air dan dilihat di bawah mikroskop tidak akan memperlihatkan warna yang kontras dengan medium di sekelilingnya, sehingga supaya dapat terlihat harus diwarnai dengan suatu zat warna. Beberapa zat yang digunakan untuk mewarnai bakteri juga dapat digunakan untuk mengamati struktur bagian dalam sel. Keuntungan lain dari pewarnaan, terutama untuk bakteri yang mempunyai sel dengan ukuran relatif kecil adalah bakteri yang diwarnai akan lebih mudah dilihat di bawah mikroskop menggunakan lensa obyektif minyak imersi yang mempunyai tingkat pembesaran relatif tinggi.

Pewarnaan sederhana adalah pewarnaan mikroba yang hanya menggunakan 1 jenis zat warna. Zat-zat warna yang biasa digunakan untuk pewarnaan sederhana misalnya *methylen blue*, *fuchsin* basa, atau violet kristal. Zat-zat warna tersebut bekerja dengan baik dalam mewarnai bakteri karena zat-zat tersebut mengandung gugusan fungsional yang dapat membentuk warna (khromofor) dan bermuatan positif. Zat-zat warna itu disebut zat warna basa. Oleh karena sel-sel bakteri pada umumnya bermuatan negatif, maka sel-sel tersebut dapat mengikat khromofor. Zat-zat warna yang mengandung khromofor yang bermuatan negatif (anion), disebut zat warna asam, dan tidak dapat digunakan untuk mewarnai bakteri karena tidak dapat diikat oleh sel bakteri.

Macam-macam cara pewarnaan yang dilakukan untuk mewarnai bakteri merupakan modifikasi atau gabungan dari cara pewarnaan sederhana. Pewarnaan bakteri dapat dibedakan atas beberapa golongan, yaitu:

1. Pewarnaan sederhana
2. Pewarnaan diferensial
 - a. Pewarnaan Gram
 - b. Pewarnaan asam cepat (*acid-fast*)
3. Pewarnaan struktural
 - a. Pewarnaan inti sel (*Feulgen*)
 - b. Pewarnaan endospora
 - c. Pewarnaan dinding sel
 - d. Pewarnaan kapsul
 - e. Pewarnaan flagella
4. Pewarnaan untuk menguji adanya komponen-komponen tertentu di dalam sel seperti:
 - a. Glikogen
 - b. Lipida

Dua cara pewarnaan yang paling mudah dan paling sering dilakukan dalam mikrobiologi pangan yaitu pewarnaan Gram dan pewarnaan endospora. Pewarnaan flagella kadang-kadang juga dilakukan, terutama dalam identifikasi bakteri.

Persiapan dan Fiksasi

Sebelum dilakukan pewarnaan, maka sel-sel bakteri harus difiksasi terlebih dahulu pada gelas obyek untuk membunuh bakteri dan membuat sel-sel bakteri tersebut melekat pada gelas obyek dengan menggunakan panas. Selain itu, fiksasi bertujuan agar organisme tidak hilang tercuci selama prosedur pewarnaan dan sel-selnya tidak menjadi salah bentuk maupun terjadi penyusutan (Hadioetomo, 1993). Prosedur yang sering dilakukan terdiri dari penyebaran kultur mikroba pada gelas obyek sehingga terbentuk lapisan sel yang tipis, pengeringan di udara terbuka, dan fiksasi secara singkat di atas nyala api. Jika kultur diambil dari medium cair, maka penyebaran dapat langsung dilakukan di atas gelas obyek yang bersih menggunakan *loop*. Tetapi jika kultur diambil dari agar padat maka sebelum di atas gelas obyek harus diberi setetes air, kemudian kultur diambil sedikit dengan ujung *loop* yang telah dipijarkan, dan diratakan di atas gelas obyek sehingga terbentuk lapisan tipis. Kesalahan yang sering dilakukan adalah pengambilan kultur yang terlalu banyak dari agar padat, sehingga akan terbentuk lapisan sel yang terlalu tebal pada gelas obyek. Keadaan ini akan menghasilkan pewarnaan yang kurang baik, terutama jika di dalam prosedurnya diperlukan tahap pencucian zat warna (*destaining/decolorizing*). Dengan adanya sel-sel bakteri yang tebal dan bertumpuk-tumpuk, sebagian zat warna akan sukar dicuci, dan tertinggal di antara atau pada sel-sel, sehingga hal ini dapat menghasilkan analisa pengamatan yang salah.

Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram merupakan salah satu cara pewarnaan yang paling sering dilakukan dalam pekerjaan mikrobiologi. Pewarnaan gram pertamakali diperkenalkan oleh seorang bakteriologi Denmark pada tahun 1884 yang bernama **Christian Gram**. Pewarnaan gram dibagi menjadi 2, yaitu gram positif dan gram negatif. Perbedaan dari kedua grup bakteri tersebut disebabkan oleh perbedaan dalam lapisan-lapisan dinding selnya.

Dalam pewarnaan gram diperlukan empat jenis larutan yaitu larutan zat warna basa, *mordant*, pencuci zat warna, dan satu zat warna lainnya (*counterstain*) yang berbeda dari zat warna yang pertama. *Mordant* adalah suatu zat yang dapat menaikkan afinitas atau pengikatan antara sel dengan zat warna. Beberapa contoh *mordant* misalnya asam,

basa, garam metal, dan yodium. Dengan adanya *mordant*, zat warna akan lebih sukar tercuci. *Pencuci warna* digunakan untuk menghilangkan zat warna dari sel bakteri. Beberapa sel bakteri lebih mudah melepaskan zat warna daripada sel-sel lainnya, perbedaan dari bakteri disebabkan oleh perbedaan dalam kecepatan melepaskan zat warna oleh sel. Zat warna kedua yang digunakan setelah sel dicuci dengan larutan pencuci disebut *counterstain* yang berbeda warnanya dari zat warna yang pertama. Sel-sel yang tidak dapat segera melepaskan zat warna setelah pencucian akan tetap berwarna seperti zat warna pertama, sedangkan sel-sel yang dapat melepaskan zat warna setelah pencucian akan mengikat zat warna kedua.

Dalam pewarnaan Gram, mula-mula sel bakteri diwarnai dengan zat warna basa yaitu *violet kristal*, diikuti perlakuan menggunakan suatu mordant yaitu *larutan iodium* (lugol). Sel kemudian dicuci dengan *alcohol* untuk menghilangkan violet kristal. Setelah dicuci dengan air, kemudian diwarnai dengan *counterstain* yaitu *fuschin*. Sel-sel yang tidak dapat melepaskan warna dan akan tetap berwarna seperti warna kristal violet yaitu biru-ungu disebut *bakteri gram-positif*, sedang sel-sel yang dapat melepaskan violet kristal dan mengikat safranin sehingga berwarna merah-merah muda disebut *bakteri gram-negatif*.

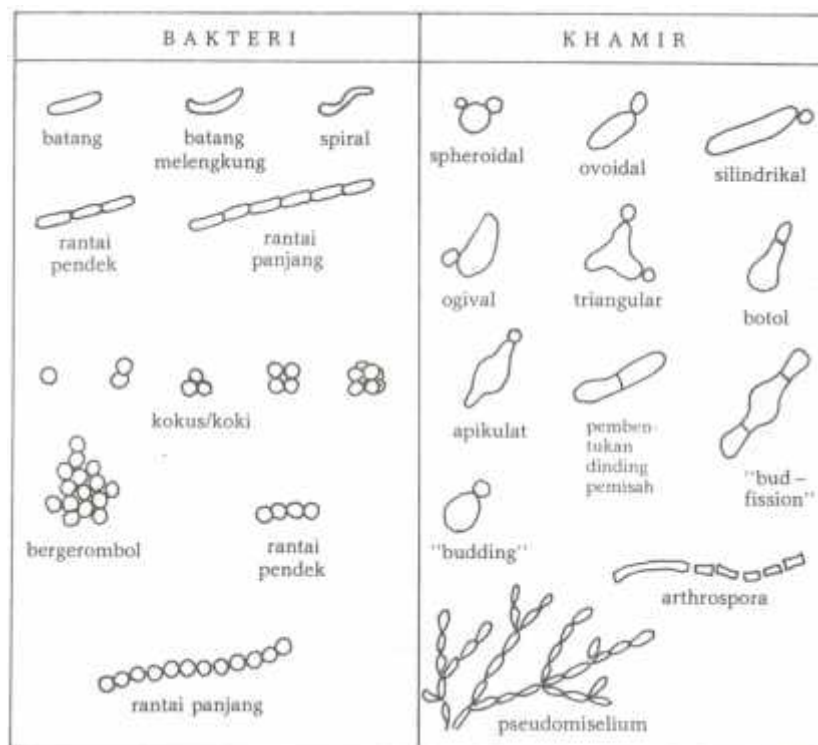
Pewarnaan Endospora

Pewarnaan khusus bertujuan untuk melihat salah satu struktur sel, seperti spora, flagela, inti sel, dan granula metakromatik, karena memiliki susunan kimia dan fisika yang berbeda, maka harus dilakukan pewarnaan khusus apabila ingin melihat struktur selnya. Ada beberapa metode pewarnaan khusus seperti pewarnaan spora, pewarnaan kapsula, perwarnaan flagel, dan pewarnaan badan inklusi (Waluyo, 2010).

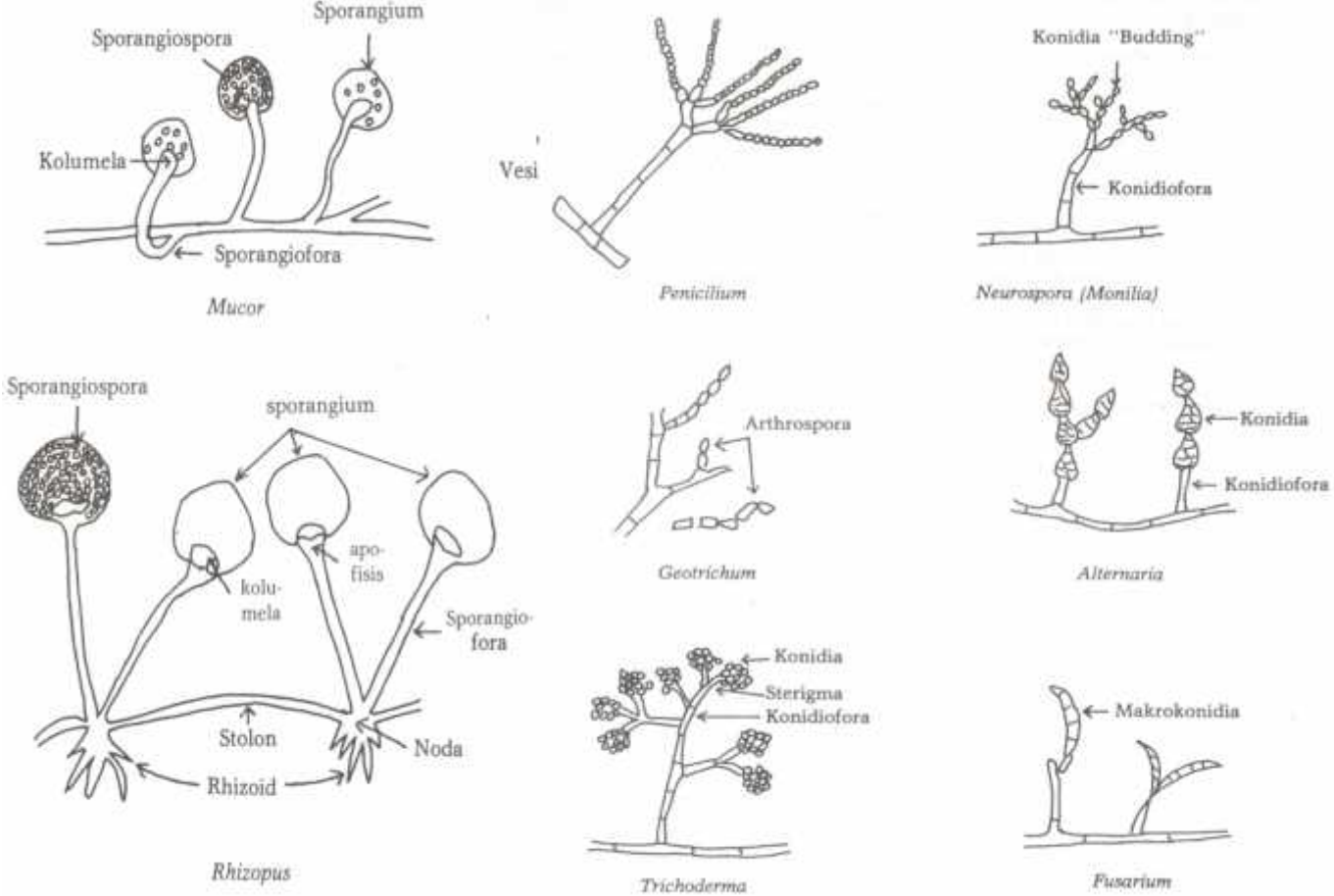
Pewarnaan spora ditujukan untuk melihat struktur spora pada beberapa bakteri yang menghasilkan spora untuk mengatasi lingkungan yang tidak menguntungkan, contohnya *Bacillus*, *Clostridium*, *Thermoactinomyces*, *Sporosarcina*, dll (Waluyo, 2010).

Spesies bakteri yang termasuk dalam genus *Clostridium* dan *Bacillus* memproduksi suatu struktur di dalam selnya yang disebut *endospora*. Jika sel semakin tua, maka sel

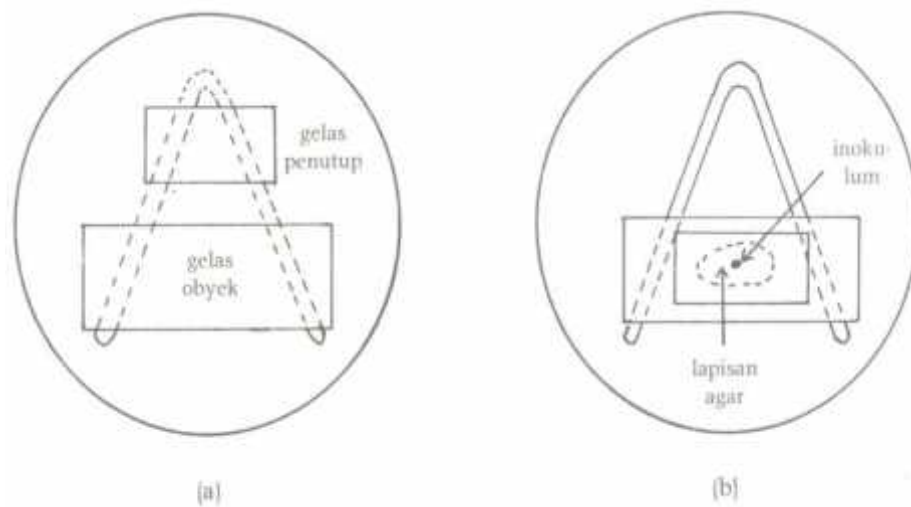
vegetatif akan pecah sehingga endospora akan terlepas menjadi *spora bebas*. Berbeda dengan sel vegetatif, maka spora akan lebih tahan lama dalam keadaan lingkungan yang ekstrim, misalnya dalam keadaan kering, panas, atau adanya bahan kimia yang beracun. Spora juga lebih tahan terhadap pewarnaan, dan sekali berhasil diwarnai, spora akan sukar untuk melepaskan zat warna, sehingga tidak dapat mengikat zat warna lainnya yang diberikan kemudian (*counterstain*). Prinsip pewarnaan ini digunakan untuk membedakan spora dari sel vegetatif. Zat warna yang paling sering digunakan untuk mewarnai spora adalah *malachite green* (Schaeffer dan Fulton) yang akan tetap diikat oleh spora setelah pencucian dengan air, dan sebagai *counterstain* digunakan *fuschin*. Dengan cara ini endospora yang masih terdapat di dalam sel vegetatif maupun spora bebas akan berwarna hijau-biru, sedangkan sel vegetatif akan berwarna merah sampai merah muda.



Gambar 2. Bentuk dan cara pengelompokkan bakteri; bentuk dan cara reproduksi khamir



Gambar 3. Bentuk beberapa jenis kapang



Gambar 4. Cara pembuatan slide culture : a. Siap untuk di sterilisasi; b. Setelah inokulasi dan siap untuk diinkubasi.

3. MATERI DAN METODE

3.1. Materi

3.1.1. Alat

Mikroskop, tabung reaksi, jarum N, bunsen, korek api, pemanas elektrik, jarum ose, kaca preparat, kaca objek, bunsen, pengukur waktu, pipet tetes, penyangga kaca preparat.

3.1.2. Bahan

Methylen blue, *malachite green*, violet kristal, lugol, safranin, larutan laktofenol blue, fuchsin, alkohol, aquades, *Monascus ruber*, *Lactococcus lactis*, *Salmonella typhi*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Saccharomyces cereviceae*, dan *Bacillus cereus*.

3.2. Metode

3.1.1. Pewarnaan pada Kapang

Pertama-tama, jarum N dipanaskan di atas api bunsen hingga berwarna merah.

Kultur (*Aspergillus sp*) diambil sedikit dengan jarum N dan dilakukan secara aseptis.

Kemudian kultur yang telah diambil diletakkan pada kaca preparat yang sebelumnya sudah dibersihkan dengan alkohol.

Lalu ditambah larutan *laktofenol blue*.

Setelah itu, kaca preparat ditutup dan preparat tersebut diamati dengan mikroskop, lalu digambar dan diberi keterangan.

3.1.2. Pengecatan Sederhana

Pertama-tama, kaca preparat dibersihkan dahulu dengan menggunakan alkohol, kemudian dikeringkan dengan menggunakan *tissue*.

Kaca preparat yang telah dibersihkan diberi aquades steril 1 tetes.

Setelah itu, kultur (*Lactobacillus Plantarum*) dipanen dengan menggunakan jarum ose yang sebelumnya telah dipijarkan dan dioleskan pada kaca preparat.

Selanjutnya olesan pada kaca preparat difiksasi dengan cara kaca dilewatkan diatas nyala api hingga mengering.

Setelah itu, diberi zat warna *methylen blue* dan didiamkan selama 3 menit. Lalu kaca preparat dibilas dengan air mengalir yang tidak deras.

Dikeringkan hingga mengering di depan kipas angin.

Setelah itu, preparat diamati dengan mikroskop, lalu digambar dan diberi keterangan.

3.1.3. Pewarnaan Gram

Pertama-tama, kaca preparat dibersihkan dahulu dengan menggunakan alkohol, kemudian dikeringkan dengan menggunakan *tissue*.

Kaca preparat yang telah dibersihkan diberi aquades steril 1 tetes.

Setelah itu, kultur (*Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*) dipanen dengan menggunakan jarum ose yang sebelumnya telah dipijarkan dan dioleskan pada kaca preparat.

Selanjutnya olesan pada kaca preparat difiksasi dengan cara kaca dilewatkan diatas nyala api hingga kering.

Setelah itu, diberi zat warna larutan violet kristal dan didiamkan selama 1 menit.

Lalu kaca preparat dibilas dengan air mengalir yang tidak deras.

Kemudian dikeringkan dan ditetesi dengan larutan lugol dan didiamkan selama 1 menit. Lalu kaca preparat dibilas dengan air lagi.

Setelah itu, warnanya dihilangkan dengan menggunakan alkohol 95% selama 10-20 detik atau sampai warna biru tidak luntur lagi.

Kemudian, diwarnai dengan safranin dan didiamkan selama 10-20 detik.

Lalu kaca preparat dibilas dengan air lagi. Kemudian dikeringkan hingga mengering di depan kipas angin.

Setelah itu, preparat diamati dengan mikroskop, lalu digambar dan diberi keterangan.

3.1.4. Pewarnaan Spora Bakteri

Pertama-tama, kaca preparat dibersihkan dahulu dengan menggunakan alkohol, kemudian dikeringkan dengan menggunakan *tissue*.

Kaca preparat yang telah dibersihkan diberi aquades steril 1 tetes.

Setelah itu, kultur (*Bacillus cereus*) dipanen dipanen dengan menggunakan jarum ose yang sebelumnya telah dipijarkan dan dioleskan pada kaca preparat.

Selanjutnya olesan pada kaca preparat difiksasi dengan cara kaca dilewatkan diatas nyala api hingga kering.

Setelah itu, diberi zat warna *malachite green* dan dipanaskan selama 5 menit di atas penangas air.

Lalu kaca preparat dibilas dengan air mengalir yang tidak deras, lalu dikeringkan.

Setelah itu, diwarnai dengan safranin dan didiamkan selama 30 detik.

Lalu kaca preparat dibilas dengan air lagi. Kemudian dikeringkan hingga mengering di depan kipas angin.

Setelah itu, preparat diamati dengan mikroskop, lalu digambar dan diberi keterangan.

3.1.5. Pewarnaan Spora Yeast

Pertama-tama, kaca preparat dibersihkan dahulu dengan menggunakan alkohol, kemudian dikeringkan dengan menggunakan *tissue*.

Kaca preparat yang telah dibersihkan diberi aquades steril 1 tetes.

Setelah itu, kultur (*Saccharomyces cereviceae*) dipanen dengan menggunakan jarum ose yang sebelumnya telah dipijarkan dan dioleskan pada kaca preparat.

Selanjutnya olesan pada kaca preparat difiksasi dengan cara kaca dilewatkan diatas nyala api hingga kering.

Setelah itu, diberi zat warna larutan violet kristal dan dipanaskan selama 3 menit di atas penangas air.

Lalu kaca preparat dibilas dengan air mengalir yang tidak deras.

Setelah itu, warnanya dihilangkan dengan menggunakan alkohol 95% selama 10-20 detik atau sampai warna biru tidak luntur lagi, lalu dikeringkan.

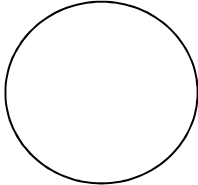
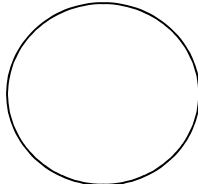
Kemudian diwarnai dengan larutan *fuchsin* dan didiamkan selama 10 detik.

Lalu kaca preparat dibilas dengan air lagi. Kemudian dikeringkan hingga mengering di depan kipas angin.

Setelah itu, preparat diamati dengan mikroskop, lalu digambar dan diberi keterangan.

3. HASIL PENGAMATAN

Tabel 1. Hasil pengamatan Mikroorganisme

Kel	Jenis Pewarnaan	Mikroorganisme	Gambar	Keterangan
				Perbesaran : Bentuk : Warna :
				Perbesaran : Bentuk : Warna :

MEDIA DAN STERILISASI

1. TUJUAN PRAKTIKUM

Praktikum ini bertujuan untuk mengetahui pentingnya sterilisasi dan hal-hal yang mempengaruhinya, mengetahui proses sterilisasi menggunakan autoklaf, mengetahui cara penggunaan autoklaf, mengetahui berbagai macam jenis media, mengetahui perbedaan dari media padat dan media cair, mengetahui cara pembuatan medium, mengetahui komposisi medium, serta mengetahui bentuk-bentuk medium.

2. TINJAUAN PUSTAKA

Media merupakan bahan atau substrat yang digunakan untuk menumbuhkan mikroorganisme. Ada beberapa syarat agar mikroba dapat tumbuh dengan baik pada media, diantaranya adalah 1) media harus mengandung semua unsur hara, 2) media harus mempunyai tekanan osmosis, tegangan permukaan, dan pH yang sesuai dan cocok dengan kebutuhan mikroba, 3) media harus dalam keadaan steril. Kebutuhan dasar mikroorganisme untuk hidup ialah air, karbon, energi, mineral, dan faktor tumbuh. Keasaman (pH) medium merupakan bagian penting untuk pertumbuhan mikroorganisme. Sebagian besar mikroorganisme tumbuh baik pada pH sekitar pH 7 (Hadioetomo, 1993).

Bentuk media sangat dipengaruhi dengan ada tidaknya penambahan bahan. Bahan-bahan yang digunakan untuk membuat medium padat adalah agar-agar, gelatin, dan silika gel. Komposisi utama agar-agar adalah galaktan. Agar dapat mencair apabila dipanaskan 100°C dan akan tetap berbentuk cair bila didinginkan sampai 43°C

Berdasarkan ada atau tidaknya zat pematat, media dibedakan menjadi tiga yaitu media padat digunakan untuk mikroba yang memerlukan kadar air yang tidak terlalu tinggi atau rendah dan umumnya digunakan untuk pertumbuhan bakteri, jamur, ragi dan terkadang juga pada mikroalga. Kedua media cair, media ini tidak membutuhkan penambahan zat padat, dan digunakan untuk mengembangbiakan mikroalga dan

mikroba lainnya misalnya untuk bakteri dan ragi. Dan yang terakhir adalah media semi solid atau semi cair, media ini membutuhkan penambahan atau pengurangan 50% zat pematat. Biasanya digunakan untuk perkembangbiakan mikrobia yang memerlukan kadar air yang banyak dan bersifat aerob atau fakultatif (Suriawiria, 2005).

Pada pembuatan media tertentu digunakan magnetic stirrer (alat pemusing magnet yang bekerja dengan tenaga listrik) pada saat media dididihkan. Fungsi dari stirrer ini sendiri yaitu untuk mencegah hangusnya atau meluapnya medium pada saat pemanasan. Tabung Durham digunakan untuk menampung gas hasil metabolisme bakteri. Tabung durham dijadikan indikator terjadinya fermentasi bila terbentuk gelembung-gelembung udara di dalam tabung Durham

Medium pembiakan selektif dalam pemakaiannya diberi bermacam-macam bentuk yang sesuai dengan tujuannya, yaitu sebagai berikut:

Bentuk medium cair

Bentuk medium padat dengan penambahan agar-agar atau gelatin.

- Bentuk lempeng, dipadatkan dalam pinggan petri.
- Bentuk miring, dipadatkan dalam keadaan miring dalam tabung.
- Bentuk tegak, dipadatkan dalam keadaan tegak dalam tabung.

Sterilisasi merupakan suatu proses untuk mematikan atau membunuh semua organisme yang terdapat pada suatu benda atau di dalam suatu benda (Hadioetomo, 1993). Alat dan bahan yang akan dipergunakan dalam bidang mikrobiologi harus selalu steril dan terbebas dari mikroorganisme yang sifatnya merusak media. Sebelum melakukan percobaan, tangan harus dicuci dengan alkohol sampai bersih untuk menghindari terkontaminasinya tubuh kita dengan bakteri yang merugikan, teknik ini disebut teknik aseptik(Hadioetomo,1993).

Sterilisasi menggunakan panas dibedakan menjadi dua sterilisasi basah dan sterilisasi kering. Sterilisasi basah adalah sterilisasi yang menggunakan panas dan uap air secara bersamaan. Sterilisasi ini dilakukan menggunakan alat yang disebut autoklaf, cara kerjanya menggunakan uap air jenuh bertekanan pada suhu 121°C selama 15 menit

(Hadioetomo, 1993). Sterilisasi basah biasa digunakan untuk mensterilkan bahan yang dapat ditembus oleh uap air dan tidak rusak bila dipanaskan dengan suhu yang berkisar 110°C dan 121°C

Autoklaf adalah bejana logam berdinding tebal yang bagian bawahnya dapat diisi dengan air dan bagian atas bejana ditutup dengan penutup yang dirapatkan dengan sekrup penutup. Dengan demikian, tekanan dapat ditimbulkan dari campuran uap dan udara. Cara menggunakan autoklaf yaitu pertama-tama pintu autoklaf ditutup rapat. Kemudian kran pada pipa uap dibuka dan temperatur akan terus-menerus naik mencapai 121°C dan penghitungan waktu selama 15 atau 20 menit dihitung ketika suhu telah mencapai 121°C (Winarno, 1994). Autoklaf tidak boleh langsung dibuka saat proses sterilisasi sudah selesai, harus menunggu manometer menunjukkan angka 0 lebih dahulu (Waluyo, 2010).

Hal-hal yang harus diperhatikan saat menggunakan autoklaf, yaitu sterilisasi bergantung pada uap sehingga udara harus dikosongkan dari ruang sterilisator, semua bagian bahan yang disterilkan harus terkena uap, bahan-bahan yang berpori atau yang berbentuk cair harus permeable terhadap uap, dan suhu yang terukur oleh termometer harus mencapai 121°C dan dipertahankan selama 15 menit (Hadioetomo, 1993).

3. MATERI DAN METODE

3.1. Materi

3.1.1. Alat

Alat yang digunakan dalam praktikum ini adalah tabung reaksi, tabung durham, rak tabung reaksi, timbangan analitik, sendok (plastik untuk $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan KH_2PO_4 , logam untuk bahan lain), autoklaf, *hot plate*, dan *stirrer*, plastik, korek api, pemanas bunsen, karet, serbet, masker, sarung tangan, tatakan untuk membuat agar miring, label, beaker glass, gelas ukur, lap, kertas buram, dan cawan petri steril.

3.1.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam praktikum ini adalah *Nutrient Agar* (NA), *Nutrient Broth* (NB), *Potato Dextrose Agar* (PDA), *Malt Extract Agar* (MEA), *deMan Rogosa Sharpe Broth* (MRSB), *deMan Rogosa Sharpe Agar* (MRSA), *Lactose broth* (LB), glukosa, pepton, ekstrak yeast, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4), alkohol, kapas, dan aquades.

3.2. Metode

3.2.1. Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA)

Sebanyak 5 gram NA ditimbang dengan neraca analitik, kemudian dimasukkan ke *beaker glass* yang berisi 250 ml aquades, kemudian *stirrer* dimasukkan ke dalam *beaker glass* tersebut kemudian dipanaskan dengan menggunakan *hot plate* sampai seluruh media larut. Setelah semua medium telah larut, pemanasan dihentikan, lalu dipindahkan ke dalam 6 tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 ml dan 18 tabung reaksi masing-masing sebanyak 10 ml .. Kemudian semua tabung reaksi ditutupi dengan kapas agar tetap steril dan dibungkus dengan menggunakan plastik bening serta diikat dengan karet gelang. Kemudian, cawan petri disiapkan, dibalik dan dibungkus dengan kertas buram dan dimasukkan ke dalam plastik. Selanjutnya, semua tabung reaksi dan cawan petri dimasukkan ke dalam autoklaf untuk proses sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi selesai, semua tabung reaksi dan cawan petri diambil. Untuk 12 tabung reaksi yang berisi 10 ml medium diletakkan dalam posisi tegak. Untuk 6 tabung reaksi yang berisi 5 ml medium diletakkan di tatakan untuk membuat agar miring. Untuk 6 tabung reaksi yang berisi 10 ml medium dipindahkan secara aseptis ke dalam cawan petri dan kemudian dibungkus lagi dengan menggunakan kertas buram untuk disimpan. Setelah itu medium didinginkan supaya memadat. Setelah semuanya memadat, medium diamati lalu digambar dan diberi keterangan wujud dan warnanya.

3.2.2. Pembuatan Media *deMan Rogosa Sharpe Broth* (MRSB)

Sebanyak 3,75 gram MRSB ditimbang dengan neraca analitik kemudian dilarutkan ke dengan 70 ml aquades dalam *beaker glass* dan diaduk rata hingga semua media larut. Setelah semua media larut, media dipindahkan ke dalam 6 tabung reaksi masing-masing sebanyak 9 ml. Kemudian semua tabung reaksi ditutup dengan kapas dan dibungkus

dengan menggunakan plastik bening serta diikat dengan karet gelang. Selanjutnya, semua tabung reaksi dimasukkan ke dalam autoklaf untuk proses sterilisasi pada suhu 121⁰C selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi selesai, ditunggu hingga dingin, kemudian media diamati, lalu digambar dan diberi keterangan wujud dan warnanya.

3.2.3. Pembuatan Media *deMan Rogosa Sharpe Agar (MRSA)*

Sebanyak 1,36 gram MRSA ditimbang dengan neraca analitik, kemudian dimasukkan ke *beaker glass* yang berisi 20 ml aquades kemudian *stirrer* dimasukkan ke dalam *beaker glass* kemudian dipanaskan dengan menggunakan *hot plate* hingga medium terlarut. Setelah semua medium telah larut, pemanasan dihentikan, lalu dipindahkan ke dalam 2 tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 ml. Kemudian semua tabung reaksi ditutup dengan kapas dan dibungkus dengan menggunakan plastik bening serta diikat dengan karet gelang. Selanjutnya, semua tabung reaksi dimasukkan ke dalam autoklaf untuk proses sterilisasi pada suhu 121⁰C selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi selesai, semua tabung reaksi diambil kemudian diletakkan di tatakan untuk membuat agar miring sampai memadat. Setelah semuanya memadat, medium diamati lalu digambar dan diberi keterangan wujud dan warnanya.

3.2.4. Pembuatan Media *Potato Dextrose Agar (PDA)*

Mula-mula 0,78 gram PDA ditimbang dengan neraca analitik, kemudian dimasukkan ke *beaker glass* yang berisi 20 ml aquades kemudian *stirrer* dimasukkan ke dalam *beaker glass* kemudian dipanaskan dengan menggunakan *hot plate* hingga medium terlarut. Setelah semua medium telah larut, pemanasan dihentikan, lalu dipindahkan ke dalam 3 tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 ml. Kemudian semua tabung reaksi ditutup dengan kapas dan dibungkus dengan menggunakan plastik bening serta diikat dengan karet gelang. Selanjutnya, semua tabung reaksi dimasukkan ke dalam autoklaf untuk proses sterilisasi pada suhu 121⁰C selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi selesai, semua tabung reaksi diambil kemudian diletakkan di tatakan untuk membuat agar miring sampai memadat. Setelah semuanya memadat, medium diamati lalu digambar dan diberi keterangan wujud dan warnanya.

3.2.5. Pembuatan Media *Malt Extract Agar* (MEA)

Sebanyak 0,96 gram MEA ditimbang dengan neraca analitik, kemudian dimasukkan ke *beaker glass* yang berisi 20 ml aquades kemudian *stirrer* dimasukkan ke dalam *beaker glass* kemudian dipanaskan dengan menggunakan *hot plate* hingga medium terlarut. Setelah semua medium telah larut, pemanasan dihentikan, lalu dipindahkan ke dalam 2 tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 ml. Kemudian semua tabung reaksi ditutup dengan kapas dan dibungkus dengan menggunakan plastik bening serta diikat dengan karet gelang. Selanjutnya, semua tabung reaksi dimasukkan ke dalam autoklaf untuk proses sterilisasi pada suhu 121⁰C selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi selesai, semua tabung reaksi diambil kemudian diletakkan di tatakan untuk membuat agar miring sampai memadat. Setelah semuanya memadat, medium diamati lalu digambar dan diberi keterangan wujud dan warnanya.

3.2.6. Pembuatan Media *Pepton Glucose Yeast* (PGY)

Sebanyak 0,06 gram glukosa, 0,03 gram pepton, 0,03 gram ekstrak yeast, 0,012 gram MgSO₄·7H₂O, 0,03 gram kalium dihidrogen fosfat (KH₂PO₄) ditimbang menggunakan neraca analitik, lalu dilarutkan dengan 15 ml aquades dalam *beaker glass* dan diaduk rata hingga semua media larut. Setelah semua media larut, media dipindahkan ke dalam 3 tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 ml. Kemudian semua tabung reaksi ditutup dengan kapas dan dibungkus dengan menggunakan plastik bening serta diikat dengan karet gelang. Selanjutnya, semua tabung reaksi dimasukkan ke dalam autoklaf untuk proses sterilisasi pada suhu 121⁰C selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi selesai, ditunggu hingga dingin, kemudian media diamati, lalu digambar dan diberi keterangan wujud dan warnanya.

3.2.7. Pembuatan Nutrient Broth (NB)




Sebanyak 0,92 gram NB ditimbang dengan neraca analitik kemudian dilarutkan ke dengan 115 ml aquades dalam *beaker glass* dan diaduk rata hingga semua media larut. Setelah semua media larut, media dipindahkan ke dalam 6 tabung reaksi masing-masing sebanyak 9 ml. Kemudian semua tabung reaksi ditutup dengan kapas dan dibungkus dengan menggunakan plastik bening serta diikat dengan karet gelang. Selanjutnya, semua tabung reaksi dimasukkan ke dalam autoklaf untuk proses sterilisasi pada suhu

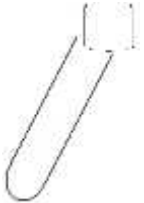


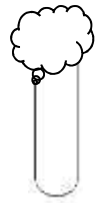
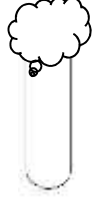
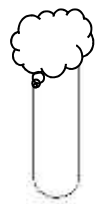
121⁰C selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi selesai, ditunggu hingga dingin, kemudian media diamati, lalu digambar dan diberi keterangan wujud dan warnanya.

3.2.8. Pembuatan *Lactose Broth* (LB)

Sebanyak 7,8 gram LB ditimbang dengan neraca analitik kemudian dilarutkan ke dengan 600 ml aquades dalam *beaker glass* dan diaduk rata hingga semua media larut. Setelah semua media larut, media dipindahkan ke dalam 60 tabung reaksi masing-masing sebanyak 10 ml. Sebanyak 60 tabung durham diisi dengan media LB, kemudian tabung durham tersebut dimasukan ke dalam tabung reaksi berisi media LB yang sebelumnya telah disiapkan (pada saat tabung durham berada di dalam tabung reaksi, harus dipastikan tidak terbentuk gelembung). Kemudian semua tabung reaksi ditutup dengan kapas dan dibungkus dengan menggunakan plastik bening serta diikat dengan karet gelang. Selanjutnya, semua tabung reaksi dimasukkan ke dalam autoklaf untuk proses sterilisasi pada suhu 121⁰C selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi selesai, ditunggu hingga dingin, kemudian media diamati, lalu digambar dan diberi keterangan wujud dan warnanya.

4. HASIL PENGAMATAN

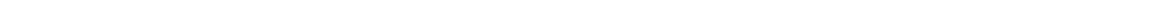
Kelompok	Media	Gambar	Keterangan
1	NA		Warna : Wujud :
		10 tabung @ 10 ml	
			Warna : Wujud :
		4 tabung @ 5 ml	
			Warna : Wujud :

6 cawan petri @10 ml		
2	MRSA	 Warna : Wujud :
	MRSB	 Warna : Wujud :
	PDA	 Warna : Wujud :
4	MEA	 Warna : Wujud :
	PGY	 Warna : Wujud :
	NB	 Warna : Wujud :
5	LB	Warna :
6		





Wujud :



FERMENTASI SPONTAN DAN NON SPONTAN

1. TUJUAN PRAKTIKUM

Tujuan dilakukannya praktikum ini adalah untuk mengetahui proses fermentasi pada pembuatan acar dan minuman fermentasi dari buah, mengetahui reaksi yang terjadi pada saat fermentasi berlangsung, mengetahui perbedaan yang terjadi antara fermentasi spontan dan non spontan, mengetahui pengaruh konsentrasi *yeast* dan garam, suhu, yang digunakan terhadap hasil, mengetahui mikroorganisme apa saja yang berperan dalam proses fermentasi, serta mengetahui hal-hal yang mempengaruhi proses fermentasi.

2. TINJAUAN PUSTAKA

Fermentasi merupakan suatu proses pemecahan senyawa kompleks menjadi komponen yang lebih sederhana oleh mikroba yang bersifat katabolik. Mikroba katabolik tersebut dapat mensintesis beberapa vitamin yang kompleks dan faktor-faktor pertumbuhan bahan lainnya. Proses fermentasi umumnya dikondisikan dalam keadaan tanpa oksigen atau anaerob, tetapi organisme fermentatifnya terkadang memerlukan oksigen untuk proses metabolisme lainnya maupun pertumbuhannya. Contoh perubahan kimia dari fermentasi meliputi: pengasaman susu, dekomposisi pati dan gula menjadi alkohol dan karbon dioksida serta oksidasi senyawa nitrogen organik. Contoh produk fermentasi oleh mikroorganisme yang dapat dimanfaatkan meliputi etil alkohol, asam laktat, asam asetat, gliserol, butilen glikol, aseton, butanol, dan asam butirat. Hasil dari fermentasi ini sendiri sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu tergantung pada jenis bahan pangan (substrat), macam mikrobial dan kondisi sekelilingnya yang mempengaruhi pertumbuhan dan metabolisme mikrobial tersebut.

Mikroba yang sering digunakan dalam proses fermentasi adalah bakteri, khamir dan jamur. Khamir selain digunakan dalam substrat cair seperti pada pembuatan minuman fermentasi wine dan bir, juga pada medium padat untuk pembuatan roti. Jamur umumnya digunakan dalam substrat cair misalnya untuk produksi tempe dan oncom,

atau digunakan untuk produk jamur itu sendiri. Bakteri asam laktat merupakan jenis mikroba yang seringkali berperan dalam proses fermentasi.

Bakteri asam laktat termasuk bakteri yang menghasilkan sejumlah besar asam laktat sebagai hasil akhir dari metabolisme gula (karbohidrat). Asam laktat yang dihasilkan tentunya akan menurunkan nilai pH dari lingkungan pertumbuhannya dan menimbulkan rasa asam. Kondisi asam tersebut umumnya akan menghambat pertumbuhan dari beberapa jenis mikroorganisme lainnya. Bakteri asam laktat selain berperan dalam proses fermentasi, juga berkontribusi besar dalam memberikan manfaat fungsional bagi tubuh manusia sebagai probiotik. probiotik didefinisikan sebagai mikroorganisme hidup dalam bahan pangan yang tercatat dalam jumlah cukup serta memberikan manfaat kesehatan saluran pencernaan.

Berdasarkan sumber mikroorganisme, proses fermentasi dibagi menjadi dua yaitu :

1. Fermentasi spontan, adalah fermentasi bahan pangan di mana dalam pembuatannya tidak ditambahkan mikroorganisme dalam bentuk starter atau ragi, namun mikroorganisme yang berperan aktif dalam proses fermentasi berkembang secara spontan karena lingkungan hidupnya dibuat sesuai untuk pertumbuhan. Aktivitas dan pertumbuhan bakteri asam laktat dirangsang karena adanya garam, contohnya pada pembuatan sayur asin dan acar.
2. Fermentasi non spontan, adalah fermentasi yang terjadi pada bahan pangan yang dalam pembuatannya ditambahkan mikroorganisme dalam bentuk starter atau ragi, di mana mikroorganisme tersebut akan berkembang biak secara aktif merubah bahan yang difermentasi menjadi produk, contohnya tempe dan minuman fermentasi.

Acar atau yang dikenal dengan *pickle* adalah sayur atau buah yang diberi garam dan diawetkan baik diberi bumbu atau tidak. Proses penggaraman dilakukan pada tahap awal pembuatan acar dengan cara fermentasi. Terkadang dilakukan penambahan gula sebanyak 1% apabila sayur atau buah yang digunakan berkadar gula rendah. Acar dibuat dengan kombinasi dua cara pengawetan yakni penggaraman dan fermentasi.

Tape adalah sebuah makanan selingan yang cukup digemari khususnya di Indonesia. Tape memiliki rasa yang manis dan sedikit mengandung alkohol, memiliki aroma yang menyenangkan dan bertekstur lunak dan berair. Namun, tape adalah produk bahan pangan yang mudah rusak karena tapai masih bisa mengalami fermentasi lebih lanjut setelah kondisi optimum fermentasi tercapai. Hasil akhir dari fermentasi lanjut dari tape adalah produk asam yang beralkohol. Produk ini tidak bisa dikonsumsi lagi karena rasanya sudah berubah dan menjadi tidak enak.

Pada pembuatan tape, biasanya dapat digunakan ragi sebagai starter, penggunaan inokulum murni akan memperbaiki produk dan mengurangi kontaminasi. Inokulum dikatakan bisa memperbaiki produk karena, di dalam inokulum terkandung organisme penghasil pigmen (kapang) yang dapat menyebabkan produk menjadi berwarna dan berasa asam. Perubahan hidrokimia yang penting pada fermentasi tapai adalah hidrolisis pati menjadi glukosa dan maltosa yang akan memberikan rasa manis serta perubahan gula menjadi alcohol dan asam organik. Fermentasi akan baik jika dilakukan pada kondisi mikroaerob, karena pada kondisi anaerob kapang tidak mampu tumbuh, sehingga tidak dapat menghidrolisis pati. Dan ketika pati tidak dapat terhidrolisis maka, aroma tidak akan berkembang dengan baik karena tidak ada fermentasi alcohol. Organisme yang berperan untuk menghasilkan tape dengan aroma yang baik adalah gabungan dari *Amylomyces rouxii*, *Endomycopsis fibuliger* dan *Hansenula anomala*. Perubahan fisik setelah proses fermentasi yaitu tekstur semakin lunak karena terjadi penurunan selulosa menjadi bentuk yang lebih sederhana.

Saccharomyces cerevisiae merupakan golongan khamir murni, yaitu khamir yang dapat berkembang biak secara seksual dengan pembentukan askospora. Untuk yeast pH optimal untuk pertumbuhan 4-4,5. Pada pH 3 atau lebih rendah lagi maka fermentasi akan berjalan dengan lambat

3. MATERI DAN METODE

3.1. Materi

3.1.1. Alat

Alat yang digunakan dalam praktikum ini adalah timbangan analitik, Bunsen, pisau, pH meter, besek, daun pisang dan toples kaca 500 ml steril.

3.1.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam praktikum ini adalah : belimbing wuluh (kloter A), bawang merah (kloter B), kedondong (kloter C), lobak putih (kloter D), bawang putih (kloter E), sawi pahit (kloter F), ragi tape, nasi, garam, dan air mineral 600 ml.

3.2. Metode

3.2.1. Pembuatan Acar

Buah yang telah dikupas, dicuci dan diiris tipis-tipis (ketebalan ± 1 mm), ditimbang sebanyak 100 gram. Kemudian, buah tersebut dimasukan ke dalam toples kaca steril yang didalamnya sudah terdapat air yang telah dicampur dengan garam. Toples kemudian ditutup rapat dan fermentasi dilakukan selama 4 hari pada suhu yang telah ditentukan.

Keterangan:

Kelompok 1 ⑦ 450 ml air + 2,5% garam; suhu dingin

Kelompok 2 ⑦ 450 ml air + 2,5% garam; suhu ruang

Kelompok 3 ⑦ 450 ml air + 5% garam; suhu dingin

Kelompok 4 ⑦ 450 ml air + 5% garam; suhu ruang

Kelompok 5 ⑦ 450 ml air + 10% garam; suhu dingin

Kelompok 6 ⑦ 450 ml air + 10% garam; suhu ruang

* % kadar garam dihitung dari berat sampel yang difermentasi

3.2.2. Pembuatan Tape

Sebanyak 50 gram nasi setengah matang disiapkan. Nasi tersebut dimasukan ke dalam besek yang sudah dilapisi dengan daun pisang. Nasi ditata dengan rapi dan padat sampai tidak terdapat lubang diantaranya. Pada nasi kelompok 1 ditambahkan ragi tape

sebanyak 0,5 % dari berat nasi. Pada kelompok 2 ditambahkan ragi tape sebanyak 1 % dari berat nasi. Kelompok 3 ditambahkan ragi tape sebanyak 1,5 % dari berat nasi. Pada kelompok 4 ditambahkan ragi tape sebanyak 2 % dari berat nasi. Pada kelompok 5 ditambahkan ragi tape sebanyak 2,5% dari berat nasi. Pada kelompok 6 ditambahkan ragi tape sebanyak 3% dari berat nasi. Besek ditutup dengan rapat dan diinkubasi selama 3 hari pada suhu ruang dan setelah 3 hari dilihat dan diamati warna, bau, rasa, dan teksturnya.

4. HASIL PENGAMATAN

4.1. Pembuatan Acar

Tabel 1. Pembuatan Acar

Kel	Bahan	Suhu Fermentasi	Konsentrasi Garam (%)	pH	Foto	Keterangan	
						Aroma: Tekstur: Warna: Rasa:	
Keterangan:							
Tekstur:		Warna:		Aroma:		Rasa:	
+	: sangat keras	+	: tidak keruh	+	: tidak asam	+	: tidak asam
++	: keras	++	: sedikit keruh	++	: agak asam	++	: agak asam
+++	: agak keras	+++	: keruh	+++	: asam	+++	: asam
++++	: lunak	++++	: sangat keruh	++++	: sangat asam	++++	: sangat asam
+++++	: sangat lunak						

4.2. Pembuatan Tape

Tabel 2. Uji Sensori Pembuatan Tape

Kelompok	Bahan	Keterangan
		Aroma: Tekstur: Warna:

Keterangan:

Aroma:

+ : tidak masam
++ : agak masam
+++ : masam
++++ : sangat masam

Tekstur:

+ : sangat keras
++ : keras
+++ : agak keras
++++ : lunak
+++++ : sangat lunak

Warna:

+ : putih
++ : putih kekuningan
+++ : kuning
++++ : sangat kuning

PENGARUH O₂

1. TUJUAN PRAKTIKUM

Tujuan dilakukannya praktikum ini adalah untuk mengetahui beberapa macam kelompok mikroorganisme, mengetahui cara membedakannya, mengetahui cara mengujinya, mengetahui media yang tepat dalam pengujian suatu mikroorganisme, dan juga mengetahui contoh mikroorganisme menurut masing-masing kelompok.

2. TINJAUAN PUSTAKA

Berdasarkan masing-masing ciri kultur tersebut maka mikroorganisme dapat diketahui dari golongan mana dengan melihat ciri pertumbuhannya pada medium (Bibiana, 1994). Salah satunya berdasarkan kebutuhan akan oksigen (O₂), pertumbuhan mikroorganisme diklasifikasikan menjadi 5, yaitu:

1. Mikroorganisme Aerob obligat

Mikroorganisme aerob obligat atau aerob adalah mikroorganisme yang memerlukan oksigen sebagai akseptor elektron dalam proses respirasi, misalnya *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas fluorescens*, dan *Mycobacteria phlei*.

2. Mikroorganisme Anaerob obligat

Mikroorganisme anaerob obligat atau anaerob adalah mikroorganisme yang tidak memerlukan O₂ karena oksigen akan membentuk H₂O₂ yang bersifat toksik, misalnya *Clostridium tetani* dan *Bacteroides fragilis*.

Di laboratorium, lingkungan anaerob dengan kandungan sekitar 0,1% O₂ dapat diperoleh dengan tabung anaerobik GasPak atau *GasPak anaerobic jar*, *agar kocok*, atau sistem asam pirrogallol-NaOH.

Mikroorganisme anaerob tidak dapat hidup dalam lingkungan konsentrasi oksigen lebih dari 0,4%. Kematian ini disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain:

- a. Kelompok mikroorganisme ini tidak memiliki atau hanya mempunyai sedikit super oksida dismutase yang mengubah superoksida (O₂) yang bersifat racun menjadi hidrogen peroksida (H₂O₂).

- b. Bakteri anaerob tidak memiliki peroksida dan katalase, yang dapat mengubah hidrogen peroksida menjadi bentuk yang tidak toksik, yaitu air dan oksigen.
 - c. Memiliki sistem enzim yang sensitif terhadap oksigen.
- 3. Mikroorganisme Anaerobik Fakultatif

Merupakan mikroorganisme yang dapat hidup di lingkungan dengan ataupun tanpa oksigen, seluruh permukaan tabung akan dipenuhi oleh mikroorganisme tetapi pada bagian atas atau bawah tabung terlihat lebih keruh; misalnya *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.
- 4. Mikroorganisme Mikroaerofil

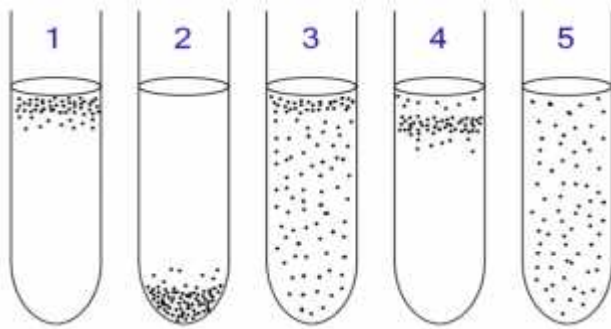
Mikroorganisme yang memerlukan oksigen dalam jumlah terbatas karena jumlah oksigen yang berlebih akan menghambat kerja enzim oksidatif dan menimbulkan kematian. Lingkungan mikroaerofil dapat diperoleh pada biakan agar kocok dan amplop GasPak khusus, yang menghasilkan 5-12% CO₂ dan 5-15% O₂, yang ditempatkan dalam tabung anaerob, misalnya *Campylobacter jejuni* (Bibiana, 1994).
- 5. Mikroorganisme Aerotoleran

Mikroorganisme ini tidak dipengaruhi oleh ketersediaan oksigen, sehingga mereka dapat ditemukan diseluruh tabung secara merata (Gaman & Sherrington, 1994).

Menurut Gaman & Sherrington (1994), tersedianya oksigen dapat mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme. Jamur bersifat aerobik (memerlukan oksigen) sedangkan khamir dapat bersifat aerobik atau anaerobik tergantung pada kondisinya. Sedangkan untuk bakteri sendiri diklasifikasikan menjadi 4 kelompok menurut keperluan oksigennya, antara lain:

- | | |
|----------------------------|----------------------------|
| a) <i>Aerob obligat</i> | c) <i>Anaerob obligat</i> |
| b) <i>Aerob fakultatif</i> | d) <i>Aerob fakultatif</i> |

Letak pertumbuhan mikroorganisme berdasarkan ketersediaan oksigennya dapat dilihat pada gambar dibawah ini:



Mikroorganisme aerob obligat tumbuh pada lapisan atas (1), anaerob obligat tumbuh pada lapisan bawah (2), mikroaerofil maka letak pertumbuhannya bergerombol di bagian tengah (4), dan anaerob fakultatif menunjukkan pertumbuhannya dalam seluruh tabung tapi paling banyak di bagian atas atau bawah (3). Jika mikroorganisme anaerob aerotoleran ditumbuhkan dalam suatu media di tabung reaksi, maka letak pertumbuhannya merata (5) (Cappuccino & Sherman, 1983).

Berdasarkan pengaruh oksigen terhadap pertumbuhan mikroorganisme, terdapat beberapa metode untuk membiakan mikroorganisme, antara lain:

a. Metode Pembiakan dalam Tabung Anaerob GasPak

Sistem GasPak digunakan untuk menumbuhkan mikroorganisme anaerob, karena mudah dan lingkungan dalam tabung hampir bebas oksigen. Dalam sistem ini, diperoleh lingkungan anaerobik yang diperkaya dengan CO_2 . Amplop yang disposable mengandung bahan kimia yang menghasilkan H_2 dan CO_2 bila ditambahkan air. Reaksi yang dikatalisasi kristal palladium mengubah H_2 dan O_2 menjadi air.

b. Metode Pembiakan dalam “Agar Kocok”

Metode ini merupakan cara untuk mengamati keperluan oksigen mikroorganisme. Biakan disiapkan dengan cara mengencerkkan nutrien agar dalam tabung. Agar didinginkan kembali sampai mencapai suhu sekitar 47°C kemudian diinokulasi.

c. Metode Pembiakan dalam Pirogallol-NaOH

Agar miring yang telah diinokulasi dapat ditumbuhkan secara anaerob dengan penambahan kristal asam pirogallol dan NaOH. Sewaktu diaktivasi dengan NaOH, asam pirogallol mereduksi oksigen dalam tabung menjadi air.

d. Metode Pembiakan dalam Tabung Berlilin

Tabung berlilin sering digunakan untuk menumbuhkan mikroorganisme kapneik, yaitu kelompok mikroorganisme yang hanya dapat tumbuh dengan baik dalam lingkungan yang kadar CO₂-nya telah ditingkatkan menjadi 0,03-5%. Lingkungan dalam tabung berlilin serupa dengan lingkungan aerob, namun kadar CO₂ lebih banyak. Pembakaran lilin mereduksi oksigen dari 20% menjadi 16% dan meningkatkan CO₂ dari 0,4% menjadi sekitar 4%, sehingga mikroorganisme kapneik dapat tumbuh.

e. Metode Pembiakan dalam Thioglikolat

Media thioglikolat termasuk media semi padat yang mengandung bahan yang untuk mengoksidasi-reduksi oksigen, yaitu thioglikolat dan sistin. Sebagai indikator, digunakan *resazurin* yang akan berwarna merah bila ada oksigen. Setelah diinkubasi, pertumbuhan mikroorganisme di media ini akan berbeda, sesuai tingkat kebutuhannya akan oksigen. Berikut ciri-ciri pertumbuhan yang terjadi:

1. Mikroorganisme anaerob

Pertumbuhan yang terjadi tidak memperlihatkan perubahan warna. Pertumbuhan terlihat sebagai kekeruhan, pembentukan gas atau flokulasi.

2. Mikroorganisme aerob

Pertumbuhan akan memperlihatkan warna kemerahan (*pink*) disebabkan oleh oksidasi indikator.

3. Mikroorganisme mikroaerofilik

Pertumbuhan bakteri akan terlihat di antara kedua bagian tersebut di atas (Lay, 1994).

3. MATERI DAN METODE

3.1 Materi

3.1.1. Alat

Jarum ose, korek api, bunsen, tabung reaksi, rak tabung reaksi, sumbat kapas, mikropipet, cuvet, masker dan sarung tangan

3.1.2. Bahan

Alkohol, *Acetobacter xylinum*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus thermophilus*, aquades steril, media *Nutrient Broth* (NB) steril dan media *deMan Rogosa Sharpe Broth* (MRSB) steril.

3.2. Metode

3.2.1. Penumbuhan *E. coli* dan *Streptococcus thermophilus*, dan *Listeria monocytogenes*

Prosedur harus dilakukan secara aseptis.

Tabung reaksi yang berisi kultur diberi aquades steril 5 ml.

Jarum ose dipijarkan hingga berwarna merah terang pada nyala api Bunsen.

Jarum ose didinginkan beberapa detik hingga dingin.

Kultur dipanen dengan cara digores dengan jarum ose (pada saat penggoresan kultur, tabung harus diletakkan di dekat api Bunsen. Ketika kultur digores, kapas sumbat tabung kultur dipegang menggunakan jari yang sebelumnya sudah disemprot alkohol, dan tidak boleh diletakkan di meja).

Hasil goresan kultur yang telah bercampur dengan aquades tersebut diambil 1 ml dengan mikropipet

Dimasukkan pada media NB

Ujung tabung reaksi dipanaskan selama beberapa detik lalu disumbat dengan kapas.

Jarum ose dipijarkan kembali untuk mematikan mikroba yang masih tersisa.

Setelah itu di inkubasi 2 hari

Diamati letak pertumbuhannya dan difoto.

3.2.2. Penumbuhan *Lactobacillus bulgaricus*

Prosedur harus dilakukan secara aseptis.

Tabung reaksi yang berisi kultur diberi aquades steril 5 ml.

Jarum ose dipijarkan hingga berwarna merah terang pada nyala api Bunsen.

Jarum ose didinginkan beberapa detik hingga dingin.

Kultur bakteri dipanen dengan cara digores dengan jarum ose (pada saat penggoresan kultur, tabung harus diletakkan di dekat api Bunsen. Ketika kultur

digores, kapas sumbat tabung kultur dipegang menggunakan jari yang sebelumnya sudah disemprot alcohol, dan tidak boleh di letakkan di meja).

Hasil goresan kultur yang telah bercampur dengan aquades tersebut diambil 1 ml dengan mikropipet

Dimasukkan pada media MRSB steril.

Ujung tabung reaksi dipanaskan selama beberapa detik lalu disumbat dengan kapas.

Jarum ose dipijarkan kembali untuk mematikan mikroba yang masih tersisa.

Setelah itu di inkubasi 2 hari

Diamati letak pertumbuhannya dan difoto.

4. HASIL PENGAMATAN

Tabel 1. Pengaruh O₂

Kelompok	Mikroorganisme	Media	Gambar	Letak Pertumbuhan

ENUMERASI

1. TUJUAN PRAKTIKUM

Tujuan dilakukan praktikum ini adalah untuk mengetahui cara menghitung jumlah koloni mikrobial dengan metode hitungan cawan (HC terdiri dari *pour plate* dan *spread plate*) dan *most probable number* (MPN), mengetahui pengaruh pengenceran terhadap jumlah koloni mikrobial, mengetahui perbedaan antara metode HC dan MPN, mengetahui perbedaan antara *pour plate* dan *spread plate*, mengetahui fungsi dari tabung Durham, mengetahui apa itu *spreader*, dan mengetahui mikroorganisme yang dapat memecah LB.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Analisa Kuantitatif Mikroba yang terdapat dalam Bahan Pangan

Pengukuran kuantitatif populasi mikroba sering diperlukan dalam berbagai penelaahan mikrobiologis. Pada hakikatnya terdapat 2 macam pengukuran dasar yaitu, penentuan jumlah sel dan penentuan massa sel. Pengukuran jumlah sel biasanya dilakukan untuk organisme bersel tunggal (misalnya, bakteri), sedangkan penentuan massa sel dapat dilakukan tidak hanya pada mikroba bersel satu tetapi juga untuk organisme berfilamen (misalnya kapang)

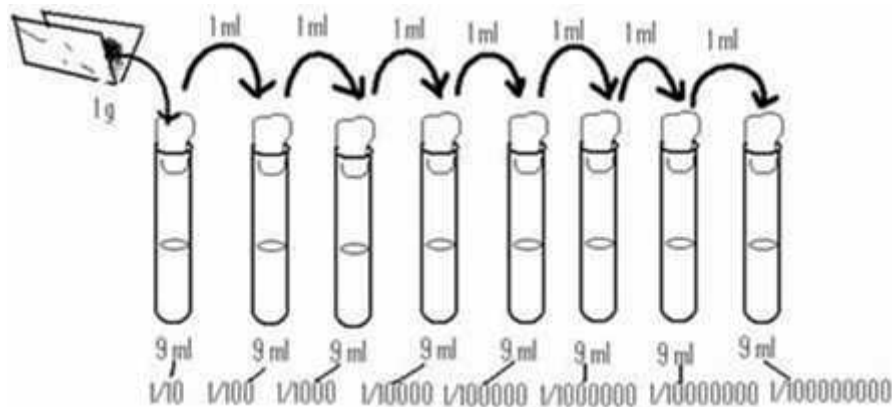
Metode Hitungan Cawan

Metode yang dapat digunakan untuk menentukan jumlah mikrobial di dalam bahan pangan terdiri dari metode hitungan cawan (HC), "*Most Probable Number*" (MPN), dan metode hitungan mikroskopik langsung. Metode lainnya yang dapat digunakan untuk menghitung jumlah mikrobial di dalam suatu larutan adalah metode turbidimetri. Tetapi metode ini sukar diterapkan pada bahan pangan karena membutuhkan larutan medium yang bening, sedangkan ekstrak bahan pangan, misalnya sari buah, biasanya mengandung komponen-komponen yang menyebabkan kekeruhan, sehingga kekeruhan larutan tidak sebanding dengan jumlah mikrobial yang terdapat di dalamnya.

Pengenceran

Bahan pangan yang diperkirakan mengandung lebih dari 300 sel mikrobia per ml, per gram atau per cm (jika dilakukan pengamatan pada permukaan luar bahan pangan), memerlukan perlakuan pengenceran sebelum ditumbuhkan pada medium agar di dalam cawan petri, sehingga setelah inkubasi akan terbentuk koloni pada cawan tersebut dalam jumlah yang dapat dihitung, dimana jumlah yang terbaik adalah diantara 30 sampai 300 koloni. Pengenceran biasanya dilakukan secara desimal yaitu 1:10, 1:100, 1:1000, dan seterusnya, atau 1:100, 1:10.000, 1:1.000.000 dan seterusnya.

Pengambilan contoh dilakukan secara aseptik dan pada setiap pengenceran dilakukan pengocokan kira-kira sebanyak 25 kali untuk memisahkan sel-sel mikrobia yang bergabung menjadi satu. Pengenceran secara desimal memudahkan dalam perhitungan jumlah koloni, sedangkan pengenceran yang bukan secara decimal misalnya 1:5, 1:25 dan seterusnya jarang dilakukan karena tidak praktis dalam perhitungannya. Untuk mengetahui jumlah mikrobia pada permukaan luar bahan pangan, misalnya daging sapi, ayam atau ikan, pengambilan contoh dapat dilakukan menggunakan metode ulas (*Swab*).



Gambar 7. Metode Pengenceran

Larutan yang digunakan untuk pengenceran dapat berupa larutan buffer fosfat, larutan garam fisiologi 0,85% atau larutan Ringer. Untuk bahan pangan yang sukar larut, ke dalam larutan pengencer pertama dapat ditambahkan pasir putih atau butir-butir gelas (*Glass beads*) yang disterilisasi bersama dengan larutan pengencer tersebut. Sebagai contoh jika contoh yang akan dianalisa adalah tepung atau pati, digunakan satu sendok

pasir kedalam 90 atau 99ml larutan pengencer pertama, sehingga sewaktu dikocok pemecahan partikel-partikel dari tepung atau pati akan lebih mudah. Butir-butir gelas dapat digunakan misalnya jika kita akan menganalisa total mikrobial dari telur sehingga bagian yang bersifat koloid dari telur dapat lebih mudah dipecahkan.

Cara Pemupukan

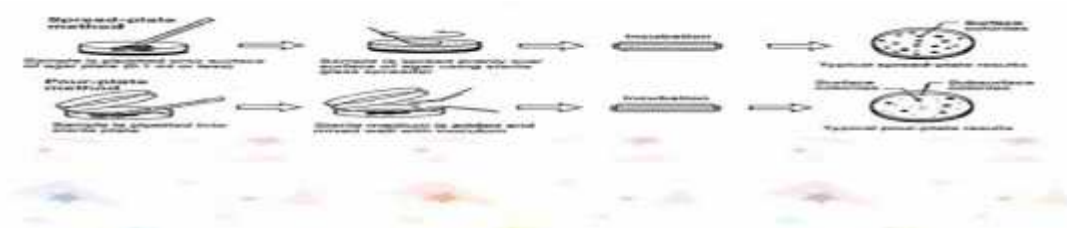
Prinsip dari metode hitungan cawan adalah jika sel mikrobial yang masih hidup ditumbuhkan pada medium agar maka sel mikrobial tersebut akan berkembang biak dan membentuk koloni yang dapat dilihat langsung dengan mata tanpa menggunakan mikroskop. Metode HC merupakan cara yang paling sensitive untuk menentukan jumlah mikrobial karena [1] Hanya sel yang masih hidup yang dapat dihitung. [2] Beberapa jenis mikrobial dapat dihitung sekaligus. [3] Dapat digunakan untuk isolasi dan identifikasi mikrobial karena koloni yang terbentuk mungkin berasal dari satu sel mikrobial dengan penampakan pertumbuhan yang spesifik.

Selain keuntungan-keuntungan tersebut metode HC juga mempunyai kelemahan-kelemahan yaitu: [1] Hasil perhitungan tidak menunjukkan sejumlah sel mikrobial yang sebenarnya karena beberapa sel yang saling berdekatan mungkin membentuk satu koloni. [2] Medium dan kondisi yang berbeda mungkin menghasilkan nilai yang berbeda. [3] Mikrobial yang ditumbuhkan harus dapat tumbuh pada medium padat dan membentuk koloni yang kompak dan jelas, tidak menyebar. [4] Memerlukan persiapan dan waktu inkubasi yang lama sehingga pertumbuhan koloni dapat dihitung. Metode HC dapat dibedakan atas dua cara yaitu Metode tuang (*pour plate*) dan Metode permukaan (*surface/ spread plate*).

1. Metode Tuang (*Pour Plate*)

Dari pengenceran yang dikehendaki, sebanyak 1 ml larutan tersebut diambil. sebaiknya antara waktu dimulainya pengenceran sampai menuangkan kedalam cawan petri tidak boleh lebih dari 30 menit. Kemudian ke dalam cawan tersebut dimasukan agar cair steril yang telah didinginkan sampai 47-50°C. Selama penuangan medium, tutup cawan tidak boleh dibuka terlalu melebar untuk menghindari kontaminasi dari luar. Segera setelah penuangan cawan petri digerakan di atas meja secara hati-hati untuk menyebarkan sel-

sel mikroba secara merata , yaitu dengan gerakan melingkar atau gerakan seperti angka delapan. Setelah agak memadat, cawan-cawan tersebut dapat diinkubasikan didalam inkubator dengan posisi terbalik.



Gambar 8. Metode *Pour Plate*

Inkubasi dilakukan pada suhu dan waktu tertentu sesuai dengan jenis mikrobia yang akan dihitung. Medium agar yang digunakan juga disesuaikan dengan jenis mikrobia yang akan ditumbuhkan. Selama inkubasi sel-sel yang masih hidup akan tumbuh dan membentuk koloni yang dapat terlihat langsung oleh mata. Setelah akhir masa inkubasi koloni yang terbentuk dihitung. Setiap koloni dapat dianggap berasal dari satu sel yang membelah jadi banyak sel, meskipun mungkin juga berasal dari lebih dari satu sel yang letaknya berdekatan. Perhitungan jumlah koloni dapat dilakukan dengan menggunakan “*Quebec Colony Counter*”. Ketelitian akan lebih tinggi jika dilakukan pemupukan secara duplo, yaitu menggunakan dua cawan petri untuk setiap pengenceran. Cara ini harus dilakukan dalam suatu pengerjaan penelitian. Tetapi untuk praktikum di kelas dimana biaya jumlah alat-alat gelas biasanya sangat terbatas, dapat digunakan satu cawan petri untuk setiap pengenceran.

2. Metode Permukaan (*Surface/ Spread Plate*)

Pada pemupukan dengan metode ini, agar steril terlebih dahulu dituangkan ke dalam cawan petri dan dibiarkan membeku. Setelah membeku dengan sempurna, kemudian sebanyak 0,1 ml sampel yang telah diencerkan dipipet pada permukaan agar tersebut. Kemudian cawan diputar-putar agar sampel tersebar ke seluruh permukaan media. Setelah dingin, batang gelas tersebut digunakan untuk meratakan contoh di atas medium agar dengan cara memutar cawan petri diatas meja. Selanjutnya inkubasi dan perhitungan jumlah koloni dilakukan seperti pada metode penuangan. Tetapi harus

diingat bahwa jumlah contoh yang ditumbuhkan adalah 0,1 ml, jadi harus dimasukkan dalam perhitungan “total count”.



Gambar 9. Metode *Spread Plate*

Cara Menghitung Koloni

Perhitungan jumlah koloni akan lebih mudah dan cepat jika pengenceran dilakukan secara desimal. Sebagai contoh misalnya penetapan jumlah koloni pada susu. Pengenceran awal 1:10 ($= 10^{-1}$) digunakan dengan cara mengencerkan 1 ml susu ke dalam 9 ml larutan pengencer, dan dilanjutkan dengan pengenceran yang lebih tinggi misalnya sampai 10^{-5} atau 10^{-6} , tergantung pada mutu susunya. Semakin tinggi jumlah mikrobial yang terdapat dalam susu, semakin tinggi pengenceran yang harus dilakukan. Jika setelah inkubasi misalnya diperoleh 62 koloni cawan yang mengandung pengenceran 10^{-4} maka jumlah koloni dapat dihitung sebagai berikut (1 ml larutan pengencer dianggap mempunyai berat 1 g)

			1	1
			Faktor pengenceran	Faktor pengenceran
Koloni per ml	= Jumlah koloni	x		
	= 62	x	$\frac{1}{10^{-4}}$	
	= 62	x	10^4	
	=			$6,2 \times 10^5$

Contoh lainnya misalnya dengan menentukan “total count” dari makanan padat. Jika 1,3 g makanan padat, misalnya keju, diencerkan dengan 48 ml larutan pengencer, dan dibuat pengenceran selanjutnya yaitu 1:7, 1:65, kemudian 1 ml dari pengenceran terakhir diencerkan lagi dengan 74 ml larutan pengencer. Dari pengenceran yang terakhir, sebanyak 0,1 ml ditumbuhkan pada permukaan cawan petri dengan agar padat. Setelah inkubasi ternyata pada pengenceran yang tertinggi tumbuh 172 koloni.

Penetapan jumlah koloni dapat dihitung sebagai berikut:

$$\begin{aligned}
 \text{Faktor pengenceran} &= \text{Pengenceran awal} \times \text{Pengenceran selanjutnya} \times \text{Jumlah yang ditumbuhkan} \\
 &= \frac{1,3}{48+1,3} \times \frac{1}{7} \times \frac{1}{65} \times \frac{1}{74+1} \times \frac{1}{10} \\
 &= \frac{1,3}{48+1,3} \times \frac{1}{7} \times \frac{1}{65} \times \frac{1}{74+1} \times \frac{1}{10} \\
 &= \frac{1,3}{49,3 \times 7 \times 65 \times 75 \times 10} \times \frac{1,3}{49,3 \times 7 \times 65 \times 75 \times 10} \\
 &= \frac{1}{49,3 \times 7 \times 65 \times 75 \times 10} \times \frac{1}{49,3 \times 7 \times 65 \times 75 \times 10} \\
 \text{Koloni per ml} &= \text{Jumlah koloni} \times \text{Faktor pengenceran} \\
 &= 172 \times \frac{1}{49,3 \times 7 \times 65 \times 75 \times 10} \\
 &= 2.225.895.000 \\
 &= 2.2 \times 10^9
 \end{aligned}$$

Cara pengenceran diatas sebenarnya bukan suatu cara yang salah, tetapi dalam perhitungan sangat tidak praktis dan memakan waktu lama. Cara yang lebih praktis adalah dengan mengencerkan contoh tersebut dengan desimal sampai pengenceran 10^{-7} , misalnya dengan cara pengenceran 1:10 (5 g contoh di dalam 45 ml larutan pengenceran), $1:10^3$, $1:10^5$, dan $1:10^7$, kemudian 1 ml dari pengenceran terakhir ditumbuhkan pada medium agar di dalam cawan petri. Setelah inkubasi diharapkan dapat terbentuk koloni sebanyak kira-kira 220 pada cawan tersebut sehingga:

$$\begin{aligned}
 \text{Jumlah koloni per gram} &= 220 \times \frac{1}{10^{-7}} \\
 &= 2.2 \times 10^9
 \end{aligned}$$

Standar Perhitungan

Untuk melaporkan suatu hasil analisis mikrobiologi digunakan suatu standar yang disebut “*Standar Plate Count*” (SPC), yang menjelaskan mengenai cara hitung koloni pada cawan serta cara memilih data yang ada untuk menghitung jumlah koloni di dalam suatu contoh. Cara menghitung koloni adalah sebagai berikut:

1. Cawan yang dipilih dan dihitung adalah yang mengandung jumlah koloni antara 30 sampai 300.
2. Beberapa koloni yang bergabung menjadi satu merupakan suatu kumpulan koloni yang besar dimana jumlah koloninya diragukan. Dapat dihitung sebagai satu koloni.
3. Suatu deretan (rantai) koloni yang terlihat sebagai suatu garis tebal dihitung sebagai satu koloni.

Data yang dilaporkan sebagai SPC harus mengikuti peraturan-peraturan sebagai berikut:

1. Hasil yang dilaporkan hanya terdiri dari dua angka, yaitu angka pertama dan angka kedua. Jika angka yang ketiga sama dengan atau lebih besar dari 5, harus dibulatkan satu angka lebih tinggi pada angka yang kedua.

Jumlah koloni per pengenceran			Standar Plate Count	Keterangan
10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}		
<u>234</u>	28	1	$2,3 \times 10^4$	28 dan 1 < 30
700	<u>125</u>	10	$1,3 \times 10^5$	$700 > 300$; $10 < 30$
TBUD	TBUD	<u>197</u>	$2,0 \times 10^6$	TBUD > 300

*TBUD = Terlalu Banyak untuk Dihitung (TBUD > 300)

2. Jika semua pengenceran yang dibuat untuk pemupukan menghasilkan kurang dari 30 koloni pada cawan petri (<30), hanya jumlah koloni pada pengenceran yang terendah yang dihitung. Hasilnya dilaporkan sebagai kurang dari 30 dikalikan dengan besarnya pengenceran, tetapi jumlah yang sebenarnya harus dicantumkan dalam tanda kurung.

Jumlah koloni per pengenceran			Standar Plate Count	Keterangan
10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}		
<u>16</u>	1	0	$< 3,0 \times 10^3$ { $1,6 \times 10^3$ }	Hitung pengenceran 10^{-2}

3. Jika semua pengenceran yang dibuat untuk pemupukan menghasilkan lebih dari 300 koloni pada cawan petri (>300), hanya jumlah koloni pada pengenceran yang tertinggi yang dihitung, misalnya dengan cara menghitung jumlahnya pada $\frac{1}{4}$ bagian cawan petri, kemudian hasilnya dikalikan 4. Hasilnya dilaporkan sebagai

lebih dari 300 dikalikan dengan besarnya pengenceran, tetapi jumlah yang sebenarnya harus dicantumkan dalam tanda kurung.

Jumlah koloni per pengenceran			Standar Plate Count	Keterangan
TBUD	TBUD	<u>335</u>	$> 3,0 \times 10^6$ $\{3,6 \times 10^3\}$	Hitung pengenceran 10^{-4}
TBUD	<u>335</u>	20	$> 3,0 \times 10^5$	Hitung pengenceran 10^{-3}

4. Jika cawan dari dua tingkat pengenceran menghasilkan koloni dengan jumlah antara 30 dan 300, dan perbandingan antara hasil tertinggi dan terendah dari kedua pengenceran tersebut lebih kecil atau sama dengan 2 tentukan rata-rata dari kedua nilai tersebut dengan menghitung pengenceran. Jika perbandingan antara hasil tertinggi dan terendah lebih besar dari 2, yang dilaporkan hanya hasil yang terkecil.

Jumlah koloni per pengenceran			Standar Plate Count	Keterangan
10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}		
<u>293</u>	<u>41</u>	4	$1,9 \times 10^4$	Rata-rata dari pengenceran karena $41000/2930041000/29300 = 1,4$ (<2)
<u>140</u>	32	2	$1,4 \times 10^4$	Hitung pengenceran 10^{-2} karena $32000/1400032000/14000 = 2,3$ (>2)

5. Jika digunakan dua cawan petri (duplo) per pengenceran, data yang diambil harus dari kedua cawan tersebut, tidak boleh diambil salah satu.

Jumlah koloni per pengenceran			Standar Plate Count	Keterangan
10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}		
<u>175</u>	16	1	$1,9 \times 10^5$	Rata-rata pengenceran 10^{-2}
<u>208</u>	17	0		
<u>138</u>	42	2	$1,5 \times 10^4$	Rata-rata dari pengenceran 10^{-2} karena perbandingan antara pengenceran 10^{-3} dan 10^{-2} adalah 2,4 (>2)
<u>162</u>	43	4		
<u>290</u>	<u>36</u>	4	$3,1 \times 10^4$	Rata-rata dari pengenceran 10^{-2} dan 10^{-3} karena perbandingan antara kedua pengenceran adalah 1,2 (<2)
<u>280</u>	<u>32</u>	1		
<u>291</u>	25	3	$3,0 \times 10^4$	Rata-rata dari pengenceran 10^{-2} meskipun $305 > 300$
<u>305</u>	27	0		

2.2. Aplikasi Metode Plate Count untuk Uji Mikrobiologis Bahan Pangan

Ada beberapa cara untuk mengukur jumlah sel, antara lain dengan hitungan mikroskopik langsung (*direct microscopik count*), hitungan cawan (*platecount*), secara elektronik dengan bantuan alat Colony Counter (*Penghitungan Koloni*), dan *Most Probable Number* (MPN). Pada prinsipnya, jika sel hidup diinokulasikan pada agar maka sel mikroba akan tumbuh dan membentuk koloni yang dapat dilihat dengan mata. Jadi dengan metode ini hanya sel hidup saja yang dapat terhitung, selain itu jenis mikroba yang tumbuh dapat diketahui dan dihitung. Metode ini juga dapat digunakan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi mikroba yang tumbuh pada bahan tertentu berdasarkan koloni yang tumbuh.

2.3. Metode Most Probable Number (MPN)

Pada metode MPN media yang digunakan adalah medium cair di dalam tabung reaksi. Perhitungan MPN didasarkan pada jumlah tabung reaksi yang positif, yaitu mikroba yang tumbuh setelah inkubasi pada suhu dan waktu tertentu. Pengamatan tabung yang positif dapat dilihat dengan mengamati timbulnya kekeruhan atau terbentuknya gas dalam tabung Durham. Untuk setiap pengenceran pada umumnya menggunakan 3 atau 5 seri tabung, semakin banyak tabung yang digunakan menunjukkan ketelitian yang lebih tinggi.

Metode MPN biasanya digunakan untuk menghitung jumlah mikroba dalam sampel yang berbentuk cair yang berada di antara campuran mikroba lain, meskipun dapat juga digunakan untuk sampel padat. Untuk metode MPN, harus lebih dahulu membuat suspensi 1:10 dari sampel tersebut, misalnya jika digunakan medium kaldu laktosa, adanya mikroba ditunjukkan dengan terbentuknya gas dalam tabung Durham. Kelompok mikroba yang dapat dihitung dengan metode MPN juga bervariasi tergantung dari medium yang digunakan untuk pertumbuhan.

Cara Menghitung MPN

Contoh : Dilakukan pengenceran secara desimal terhadap suatu bahan pangan. Kemudian sebanyak 1ml larutan dari masing-masing pengenceran dimasukkan ke dalam tabung berisi media Broth, dan setiap pengenceran menggunakan 3 seri tabung. Setelah

inkubasi, tabung positif diamati, ditandai dengan timbulnya kekeruhan pada tabung. Misalnya pada pengenceran 10^{-1} ketiga tabung menghasilkan pertumbuhan positif, pada pengenceran 10^{-2} dua tabung positif, pada pengenceran 10^{-3} satu tabung positif. Maka kombinasinya menjadi 3, 2, 1. Nilai MPN kemudian dihitung dengan cara :

Kombinasi : 3,2,1

Nilai MPN (lihat tabel MPN 3 tabung) : 150

$$\begin{aligned} \text{MPN Count} &= \text{Nilai MPN} \times \frac{1}{\text{Pengenceran tabung yang di tengah}} \\ &= 150 \times 150 \times \frac{1}{10^{-2}} \times \frac{1}{10^{-2}} \\ &= 150 \times 150 \times 10^{-2} \end{aligned}$$

3. MATERI METODE

3.1. Materi

3.1.1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam praktikum ini adalah tabung reaksi, rak tabung reaksi, tabung durham, kapas, bunsen, korek api, cawan petri steril, pemanas elektrik, jarum ose, vortex, kertas pembungkus, pipet, colony counter, inkubator 30-32°C, erlenmeyer, dan neraca.

3.1.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam praktikum ini adalah aquades, alkohol, kultur *Staphylococcus aureus*, media NA cair, media *Lactose Broth*, air tambak ikan (kloter A), air cuci beras (kloter B), air bekas pencucian buah (kloter C), air bekas pencucian sayur (kloter D), air sungai banjir kanal (kloter E), air AC (kloter F), dan air keran (kloter G).

3.2. Metode

3.2.1. Pengenceran Kultur

Tambahkan kultur *Staphylococcus aureus* dengan 5 ml aquades yang sudah disterilkan dan pindahkan dalam tabung reaksi.

Vortex tabung tersebut hingga diperoleh pengenceran 10^0 .

Ambil 1 ml larutan tersebut kemudian dituangkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml aquades steril lalu divortex sehingga diperoleh pengenceran 10^{-1} (Kelompok 1).

Ambil 1 ml larutan dari pengenceran 10^{-1} kemudian dituangkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml aquades steril lalu divortex sehingga diperoleh pengenceran 10^{-2} (Kelompok 2).

Lakukan pengenceran hingga didapatkan pengenceran 10^{-6} (kelompok 6)

3.2.2. Metode Hitungan Cawan

3.2.2.1. Metode *Pour Plate*

Ambil 1 ml kultur *Staphylococcus aureus* pada masing-masing pengenceran, masukkan ke dalam cawan petri dan diputar-putar hingga merata.

Tuang media NA yang sudah disterilkan dan diturunkan suhunya kedalam cawan lalu diputar-putar hingga merata.

Biarkan media hingga memadat, kemudian bungkus kembali dengan kertas buram.

Inkubasi media selama 2 hari dengan posisi terbalik.

Amati dan hitung jumlah koloni per ml dengan rumus :

$$\begin{aligned} \text{Jumlah koloni per ml} &= \text{jumlah koloni} \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}} \\ \text{Jumlah koloni per ml} &= \text{jumlah koloni} \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}} \times 10 \end{aligned}$$

3.2.2.2. Metode *Spread Plate*

Tuang media NA steril ke dalam cawan petri dan biarkan hingga memadat.

Ambil 0,1 ml kultur *Acetobacter xylinum* dari masing-masing pengenceran dan masukkan ke dalam cawan petri.

Putar kultur cawan tersebut agar kultur merata, kemudian cawan dibungkus kembali dengan kertas buram dan inkubasikan selama 2 hari.

Amati dan hitung jumlah koloni per ml nya menggunakan rumus :

$$\text{Jumlah koloni per ml} = \text{jumlah koloni} \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}}$$

3.2.2.3. Metode Most Probably Number (MPN)

Siapkan media LB dalam 9 tabung reaksi dan diberi tabung durham.

Pastikan tidak ada gelembung pada tabung durham, apabila ada gelembung, percobaan harus diulangi.

Sterilisasi media tersebut dan turunkan suhunya.

Tambahkan 1 ml sampel pada masing-masing tabung; 3 tabung pertama diisi dengan pengenceran 10^{-1} , 3 tabung kedua diisi dengan pengenceran 10^{-2} pada 3 tabung kedua, dan 3 tabung ketiga diisi dengan pengenceran 10^{-3} .

Inkubasikan tabung tersebut selama 2 hari dan amati keberadaan gelembung pada masing-masing tabung.

Jika pada pengenceran 10^{-1} tabung durham yang mengandung gelembung hanya 1 maka pada hasil pengamatan kolom 10^{-1} ditulis 1. Jika pada pengenceran 10^{-1} tabung durham yang mengandung gelembung hanya 2 maka pada hasil pengamatan kolom 10^{-1} ditulis 2. Begitu seterusnya pada masing-masing pengenceran. Kemudian hasil urutan 3 angka yang tersusun dicocokkan dengan tabel nilai MPN untuk 3 seri tabung.

4. HASIL PENGAMATAN

4.1. Metode Hitungan Cawan

4.1.1. *Pour Plate*

Tabel 1. *Pour Plate*

Kelompok	Pengenceran	Jumlah koloni/mL

4.1.2. *Spread Plate*

Tabel 2. *Spread Plate*

Kelompok	Pengenceran	Jumlah koloni/mL

4.2. Metode Most Probable Number (MPN)

Tabel 3. MPN

Kelompok	Tabung Positif			MPN Number	MPN Count	Keterangan
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³			
Positif :						
Negatif :						

Tabel MPN per ml/gr mempergunakan 3 tabung masing-masing diinokulasi dengan 1ml contoh dari pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} (SII 0717-83)

Tabung Positif			M.P.N (A.P.M)	Tabung Positif			M.P.N (A.P.M)
1ml 10^{-1}	1ml 10^{-2}	1ml 10^{-3}		1ml 10^{-1}	1ml 10^{-2}	1ml 10^{-3}	
1	2	3	4	5	6	7	8
0	0	1	3	2	1	0	15
0	0	2	6	2	1	1	20
0	0	3	9	2	1	2	27
0	1	0	3	2	1	3	34
0	1	1	6	2	2	0	21
0	1	2	9	2	2	1	28
0	1	3	12	2	2	2	35
0	2	0	6	2	2	3	42
0	2	1	9	2	3	0	29
0	2	2	12	2	3	1	36
0	2	3	16	2	3	2	44
0	3	0	9	2	3	3	53
0	3	1	13	2	0	0	9
0	3	2	16	2	0	1	14
0	3	3	19	2	0	2	20
1	0	0	4	2	0	3	26
1	0	1	7	3	0	0	23
1	0	2	11	3	0	1	39
1	0	3	15	3	0	2	64
1	1	0	7	3	0	3	95
1	1	1	11	3	1	0	43
1	1	3	19	3	1	1	75
1	2	0	11	3	1	2	120
1	2	1	15	3	1	3	160
1	2	2	20	3	2	0	93

1	2	3	24	3	2	1	150
1	3	0	16	3	2	2	210
1	3	1	20	3	2	3	290

ISOLASI

1. TUJUAN PRAKTIKUM

Tujuan dilakukannya praktikum ini adalah mengetahui manfaat dan cara melakukan isolasi, mengetahui cara melakukan pemindahan kultur mikrobial, mengetahui faktor-faktor dan ciri-ciri pertumbuhan mikrobial, mengetahui bentuk-bentuk koloni mikrobial, mengetahui ciri genus dari mikrobial yang diisolasi, mengetahui penyebab dan jenis mikrobial yang mengkontaminasi, mengetahui mikroorganisme yang tumbuh pada nasi basi, sayuran busuk, buah busuk, air fermentasi sayur asin, santan basi dan susu basi, mengetahui kenampakan mikroorganisme pada media dan bahan pangan.

2. TINJAUAN PUSTAKA

Untuk mempelajari sifat dari masing-masing mikrobial termasuk sifat pertumbuhan, morfologi, dan fisiologisnya, masing-masing mikrobial tersebut harus dipisahkan antara satu dengan yang lainnya, sehingga dapat terbentuk suatu kultur murni. Kultur murni adalah suatu biakan yang terdiri dari sel-sel dari suatu spesies atau satu galur mikrobial. Isolasi adalah suatu metode yang digunakan untuk memisahkan mikroorganisme dalam medium menjadi sel yang individu yang disiapkan untuk mendapatkan spesies tunggal. Isolasi dilakukan dengan cara menggoreskan suspensi atau campuran sel pada suatu media padat, yang kemudian menginkubasinya, sehingga setiap sel akan tumbuh membentuk suatu koloni (berkelompok/menggerombol).

2.1. Cara Aseptik

Cara aseptik harus dilakukan dalam setiap pekerjaan mikrobiologi. Aseptik merupakan suatu kondisi dimana terjadinya kontaminasi oleh mikrobial lain yang tidak dikehendaki dicegah semaksimal mungkin, sedangkan mikrobial yang dikehendaki dipertahankan semaksimal mungkin. Untuk memindahkan sel-sel mikrobial dari satu medium ke medium yang lainnya, digunakan suatu kawat yang diberi batang pemegang di bagian pangkalnya, yang disebut jarum ose atau *loop*. Jarum ose harus dipijarkan sampai berwarna merah bata sesaat sebelum dan sesudah digunakan. Dengan pemijaran, bagian

dari jarum ose akan menjadi steril untuk sementara karena mikrobia yang ada pada permukaan jarum ose akan mati. Pemijaran pada jarum ose harus rata pada semua permukaannya dari mulai ujung sampai dengan pangkal dekat tangkai pemegang, dengan nyala merah yang bersamaan. Sebelum dilakukan untuk inolasi, jarum ose yang telah memijar/menyala harus didinginkan dalam waktu beberapa detik untuk mencegah kematian mikrobia yang akan diinokulasikan dalam percobaan.

Sebelum melakukan pemindahan kultur, meja yang digunakan harus disemprot dengan alkohol dan dilap dengan *tissue* bersih. Termasuk tangan harus diusap dengan alkohol. Dalam melakukan pemindahan kultur, tabung reaksi harus dipegang dengan tangan kiri, kemudian untuk membuka tutup tabung (berupa kapas) dilakukan dengan tangan kanan dengan cara menjepit tutup tersebut diantara jari-jari tangan kanan. Tutup tabung sangat tidak diperbolehkan untuk diletakkan di atas meja, karena hal ini akan mengakibatkan kontaminasi pada tutup dan mulut tabung. Segera setelah tutup tabung dibuka, mulut dan leher tabung harus segera dipanaskan, namun pemanasan tidak boleh terlalu lama karena akan mengakibatkan kematian pada kultur mikrobia. Sebaiknya, dalam melakukan pemindahan kultur, semua peralatan yang digunakan harus selalu berada dekat dengan api untuk menghindari kontaminasi pada semua alat yang digunakan. Kemudian, kultur mikrobia diambil dengan jarum ose yang telah dipijarkan. Setelah selesai, mulut dan leher tabung dipanaskan kembali dan segera ditutup. Setelah jarum ose digunakan, jarum ose dipijarkan lagi untuk membunuh sisa kultur mikrobia yang menempel pada jarum ose. Pekerjaan secara aseptis ini harus dilakukan dengan hati-hati namun tetap secepat mungkin untuk menghindari terjadinya kontaminasi.

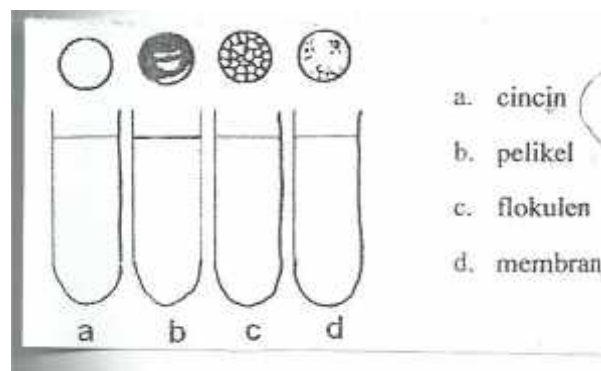
2.2. Medium Cair

Cara yang paling sederhana untuk menyimpan suatu kultur mikrobia adalah dengan menumbuhkannya di dalam suatu medium cair, dengan suhu dan waktu inkubasi tertentu tergantung pada jenis mikrobianya. Di dalam medium cair, mikrobia akan tumbuh dalam waktu 24-48 jam. Pertumbuhan mikrobia dalam suatu medium cair dapat terlihat dalam berbagai bentuk, yaitu:

1. Kekeruhan, terlihat pada seluruh bagian medium.

2. Pertumbuhan pada permukaan yang berbentuk pelikel, cincin, flokulen, atau membran.
3. Sedimen/endapan, yaitu kumpulan sel-sel yang mengumpul pada dasar tabung dan akan menyebar lagi jika tabung digerakkan atau dikocok. Medium pada bagian atas tabung mungkin akan tetap bening jika diinkubasi lebih lama.

Beberapa bentuk pertumbuhan mikrobia pada permukaan dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Pertumbuhan mikrobia pada permukaan

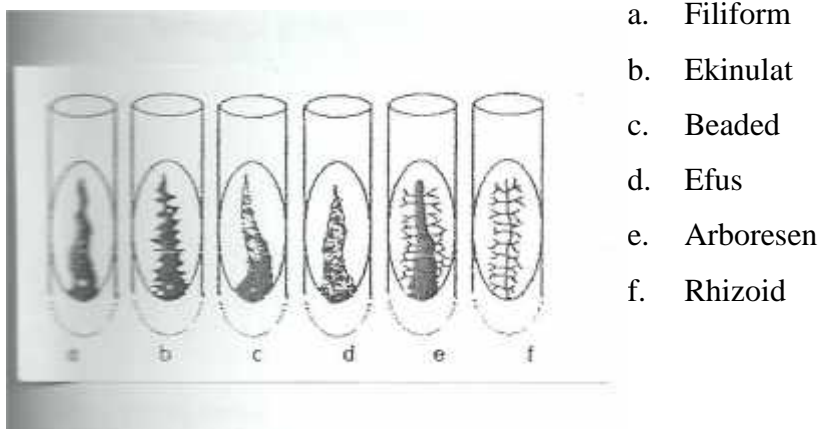
Kultur cair dapat disimpan dengan cara dibekukan atau dikeringkan, sehingga sel-sel mikrobia berada dalam keadaan *dormant*, yaitu keadaan dimana mikrobia dalam keadaan tidak mati namun tidak dapat tumbuh dan berkembangbiak. Karena banyak sel mikrobia yang tidak tahan terhadap pembekuan atau pengeringan, maka cara yang paling baik dalam menyimpan kultur mikrobia dalam jangka waktu yang lama adalah dengan melakukan liofilisasi (*freeze drying*). *Freeze drying* adalah suatu cara untuk membekukan kultur dengan campuran es kering (*dry ice*) dan alkohol, kemudian dikeringkan secara vakum. Dengan cara ini kultur mikrobia dapat disimpan selama bertahun-tahun tanpa kehilangan keaktifannya.

2.3. Medium Agar (Medium Padat)

Agar miring merupakan salah satu bentuk medium padat yang dapat digunakan untuk membiakkan mikrobia, terutama yang bersifat aerobik dan anaerobik fakultatif. Ciri-ciri kultur berupa pembentukan warna dan bentuk pertumbuhan dapat diamati pada agar miring. Inokulasi mikrobia pada agar miring dapat dilakukan dengan cara

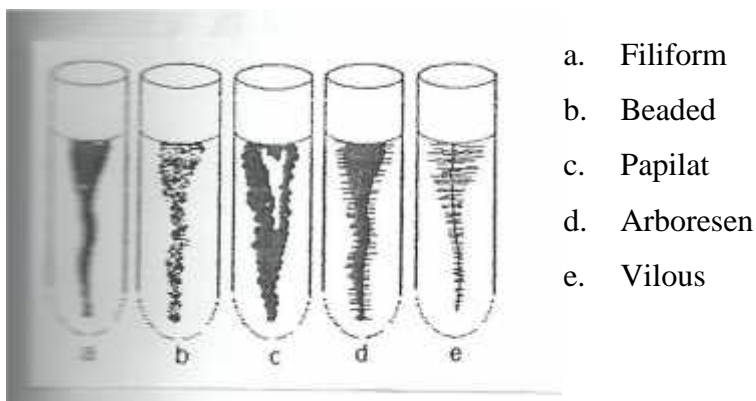
menggoreskan (*streak*) secara zig-zag pada permukaan agar miring menggunakan jarum ose yang pada bagian atasnya dilengkungkan, atau menusukkan *loop* pada bagian tengah tabung (*stab*). Cara penusukan (*stab*) juga dapat dilakukan pada agar tegak, yang digunakan untuk menstimulir pertumbuhan mikrobial pada keadaan kekurangan oksigen atau anaerobik. Setelah inkubasi pada suhu dan waktu tertentu, pertumbuhan mikrobial pada agar miring dan tegak akan terlihat pada berbagai bentuk. Agar miring dapat digunakan untuk menyimpan kultur dalam jangka waktu pendek di dalam lemari es (*refrigerator*) pada suhu 4°C. Sedangkan agar tegak sering digunakan dalam uji motilitas suatu mikrobial.

Beberapa bentuk pertumbuhan mikrobial pada agar miring dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Pertumbuhan mikrobial pada agar miring

Beberapa bentuk pertumbuhan mikrobial pada agar tegak dapat dilihat pada Gambar 3.

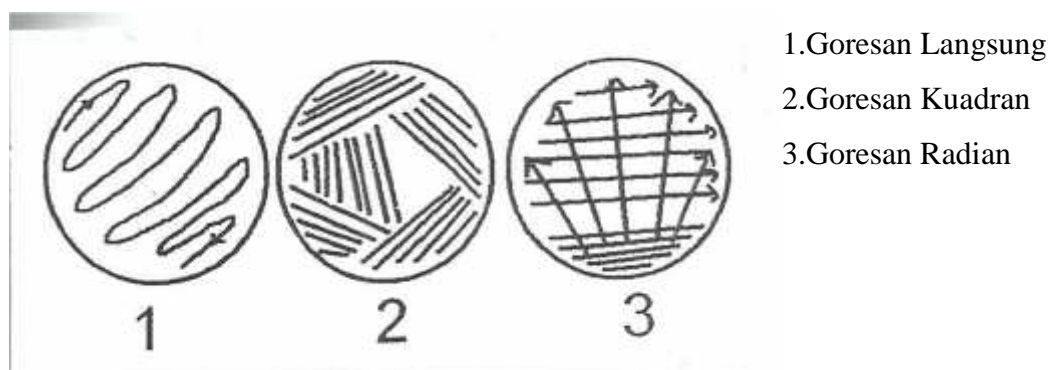


Gambar 3. Pertumbuhan mikrobial pada agar tegak

2.4. Metode Pemurnian atau Purifikasi pada Agar Cawan

Kultur mikrobia dapat dibiakkan dengan cara menginokulasikan pada agar cawan, kemudian penyebaran kultur di atas agar dilakukan dengan menggunakan *loop* yang dilengkungkan bagian atasnya atau menggunakan batang gelas. Tujuan dari penyebaran kultur adalah untuk memisahkan sel-sel mikroba satu dengan yang lainnya, sehingga setelah inkubasi pada suhu dan waktu tertentu masing-masing sel kemudian akan tumbuh dan berkembang biak membentuk kumpulan sel atau koloni yang dapat dilihat oleh mata. Pada bagian agar tempat dimulainya goresan populasi mikrobia biasanya terlalu pekat sehingga koloni akan berkumpul menjadi satu. Dengan semakin banyaknya goresan atau penyebaran yang dilakukan, maka akan semakin sedikit sel-sel yang dibawa oleh *loop*, sehingga setelah inkubasi akan terbentuk koloni-koloni secara terpisah. Satu koloni mungkin berasal dari satu sel atau beberapa sel, tergantung dari tingkat penyebaran atau kemurnian kultur. Goresan dan pembiakkan yang diulangi beberapa kali terhadap satu koloni yang tumbuh terpisah pada agar cawan akan menghasilkan koloni-koloni yang berasal dari satu sel. Koloni ini dapat diambil dan dibiakkan pada agar miring untuk mendapatkan suatu kultur murni yang terdiri dari satu spesies mikroba.

Beberapa cara untuk menggoreskan kultur pada agar cawan, dapat dilihat pada Gambar 4.

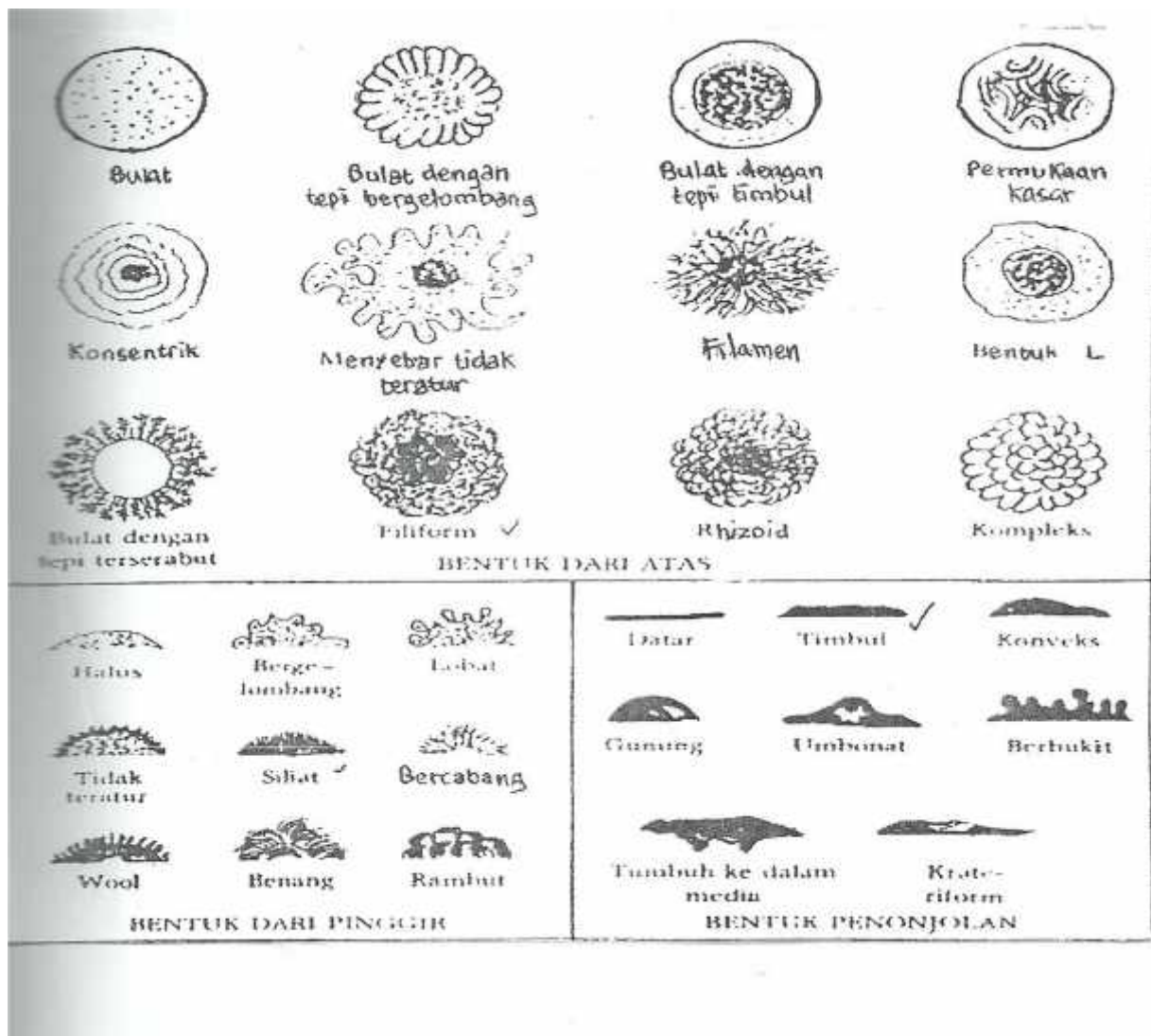


Gambar 4. Cara menggoreskan kultur

Pada masing-masing cara, *loop* harus selalu dipijarkan dan didinginkan segera sebelum melakukan goresan berikutnya. Sebagai contoh pada cara goresan kuadran, diantara

goresan pertama dan kedua, kedua dan ketiga, serta ketiga dan keempat, *loop* harus dipijarkan dan kemudian didinginkan dengan cara memasukkan pada bagian pinggir agar cawan. Koloni yang tumbuh pada agar cawan dapat dibedakan dalam besar, warna, penampakkannya apakah keruh (*opaque*) atau bening, bentuk penyebarannya, bentuk kemunculannya diatas agar, dan bentuk permukaan.

Bentuk pertumbuhan koloni di atas agar cawan dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Bentuk pertumbuhan koloni di atas agar cawan

3. MATERI DAN METODE

3.1. Materi

3.1.1. Alat

Alat-alat yang dibutuhkan dalam praktikum ini antara lain masker, sarung tangan, tabung reaksi, cawan petri, rak tabung reaksi, jarum ose, jarum N, kapas, bunsen, korek api, dan label.

3.1.2. Bahan

3.1.2.1. Isolasi

Bahan-bahan yang digunakan dalam pengisolasian kultur antara lain media NA steril, alkohol, gethuk (kelompok 1), ikan busuk (kelompok 2), daging ayam busuk (kelompok 3), daging sapi busuk (kelompok 4), rebung busuk (kelompok 5) dan wajik busuk (kelompok 6).

1.1.2.2. Inokulasi Mikroba pada Agar Tegak

Bahan-bahan yang digunakan dalam inokulasi mikroba antara lain media semi padat (NB+agar) steril, alkohol, dan isolat masing-masing kelompok.

1.1.2.3. Pemurnian Mikroba

Bahan-bahan yang digunakan dalam pemurnian mikroba antara lain NA steril, alkohol, dan isolat masing-masing kelompok

3.2. Metode

3.2.1. Isolasi

Media NA steril dibiarkan memadat dengan posisi miring, untuk memperoleh agar miring.

Meja dilap dengan alkohol, kemudian tangan dicuci juga dicuci dengan alkohol terlebih dahulu.

Jarum ose dipijarkan sampai berwarna merah pada seluruh bagiannya agar steril.

Lalu tabung reaksi yang berisi media steril dipegang dengan menggunakan tangan kiri, tutup tabung dibuka (**tutup tabung tetap dipegang, jangan diletakan diatas meja** karena akan menyebabkan kontaminasi pada tutup tabung).

Setelah itu mulut tabung reaksi dipanaskan sebentar diatas api.

Kemudian bagian sampel yang busuk diambil sedikit dengan jarum ose.

Lalu digoreskan secara zig-zag pada permukaan agar miring.

Mulut dan tutup tabung reaksi dipanaskan lagi dan ditutup, jarum ose juga dipijarkan kembali.

Kemudian diinkubasi selama 2 hari, pertumbuhan yang terjadi diamati, digambar, dan diberi keterangan mengenai warna dan bentuk pertumbuhannya.

3.2.2. Inokulasi Mikroba pada Agar Tegak

Media semi padat steril (NB + agar) dan sampel hasil isolasi disiapkan

Meja dilap dengan alkohol, kemudian tangan dicuci juga dicuci dengan alkohol terlebih dahulu.

Jarum N (jarum ose lurus) dipijarkan sampai berwarna merah pada seluruh bagiannya agar steril.

Lalu tabung reaksi yang berisi sampel hasil isolasi dipegang dengan menggunakan tangan kiri, tutup tabung dibuka (**tutup tabung tetap dipegang, jangan diletakan diatas meja** karena akan menyebabkan kontaminasi pada tutup tabung). Mulut tabung dibakar sebentar.

Jarum N dioleskan pada isolat mikrobial, mulut tabung dibakar dan ditutup kembali.

Lalu tabung reaksi yang berisi media semi padat steril dipegang dengan menggunakan tangan kiri, tutup tabung dibuka (**tutup tabung tetap dipegang, jangan diletakan diatas meja** karena akan menyebabkan kontaminasi pada tutup tabung). Setelah itu mulut tabung reaksi dipanaskan sebentar diatas api.

Jarum N yang sudah dioleskan dengan isolat, ditusukkan pada media semi padat tersebut, kemudian mulut tabung dibakar lalu ditutup dan jarum N pun dipijarkan kembali.

Kemudian diinkubasi selama 2 hari, pertumbuhan yang terjadi diamati, digambar, dan diberi keterangan mengenai warna dan bentuk pertumbuhannya.

3.2.3. Pemurnian Mikroba

Sampel hasil isolas disiapkan.

Meja dilap dengan alkohol, kemudian tangan dicuci juga dicuci dengan alkohol terlebih dahulu.

Media NA dituangkan dalam cawan petri secara aseptis, kemudian dibiarkan memadat.

Jarum ose dipijarkan sampai berwarna merah pada seluruh bagiannya agar steril.

Lalu tabung reaksi yang berisi sampel hasil isolasi dipegang dengan menggunakan tangan kiri, tutup tabung dibuka (**tutup tabung tetap dipegang, jangan diletakan diatas meja** karena akan menyebabkan kontaminasi pada tutup tabung). Mulut tabung dibakar sebentar.

Jarum ose steril tersebut dioleskan pada isolat mikrobial, kemudian bakar kembali mulut tabung, lalu ditutup.

Jarum ose digoreskan pada media yang telah memadat dicawan petri dengan menggunakan teknik penggoresan langsung (kelompok 1-3) dan teknik penggoresan kuadran (kelompok 4-6) secara aseptis.

Cawan petri dibungkus kembali dengan kertas buram dan diinkubasi selama 2 hari, diamati pertumbuhannya, digambar dan diberi keterangan mengenai warna dan bentuk pertumbuhannya.

4. HASIL PENGAMATAN

Tabel 1. Isolasi

Kelompok	Bahan	Media	Gambar	Bentuk Pertumbuhan	Warna

Tabel 2. Pemindahan Kultur

Kel	Mikroorganisme	Media	Gambar	Bentuk Pertumbuhan	Warna

Tabel 3. Inokulasi Mikroba pada Agar Tegak

Kelompok	Bahan	Media	Gambar	Bentuk Pertumbuhan

Tabel 4. Pemurnian Mikroba

Kelompok	Bahan	Media	Gambar	Bentuk Pertumbuhan	Warna